

Nachhaltige chemoenzymatische Synthese von Oligosacchariden auf Glykoarrays zur Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Lars Hillringhaus
aus Wuppertal

1. Referentin oder Referent:	apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening
2. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. Jürgen Seibel
eingereicht am:	19.01.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	20.04.2009
Druckjahr 2009	

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Hellmuth, H., Hillringhaus, L., Höbbel, S., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Seibel, J. Highly efficient Chemoenzymatic Synthesis of Novel branched Thiooligosaccharides via Substrate Direction using Glucansucrases. ChemBioChem 2007, 8, 273-276.

Tagungsbeiträge

Hillringhaus, L.: Carbohydrate Microarrays-Deciphering the Glycocode (Vortrag) EuCheMS-Kongress Turin, Italien (2008).

Hillringhaus, L., Hellmuth, H., Höbbel, S., Seibel, J.: Chemoenzymatic Synthesis of Thio-Oligosaccharides (Poster) Glycomics: From Biology to Therapeutics, London, UK (2008).

Hillringhaus, L., Hellmuth, H., Höbbel, S., Seibel, J.: Chemoenzymatic Synthesis of Thio-Oligosaccharides (Poster) 4. Glycan-Forum, Berlin (2008).

Hillringhaus, L., Seibel, J.: Development of Carbohydrate Microarrays (Poster) 10. Statusseminar Chiptechnologien, Frankfurt (2008).

Hillringhaus, L., Hellmuth, H., Höbbel, S., Seibel, J.: Chemoenzymatic Synthesis of branched Thioglycosides (Poster) European BioPerspectives, Köln (2007).

Hillringhaus, L., Hellmuth, H., Höbbel, S., Seibel, J.: Chemoenzymatic Synthesis of Thio-Oligosaccharides (Poster) 7. Carbohydrate Bioengineering meeting (CBM7), Braunschweig (2007).

Seibel, J., Hellmuth, H., Hillringhaus, L., Moraru, R., Götze, S., Beine, R.: Neuartige enzymatische Glykosylierungsmethoden zur Synthese von Oligosacchariden, Glykopeptiden und Glykokonjugaten (Poster) 40. Jahrestreffen Deutscher Katalytiker, Weimar (2007).

INHALT

1 Einführung	1
2 Kohlenhydrate	3
2.1 Glykoproteine	4
3 Synthese von Kohlenhydraten	12
3.1 Chemische Synthese	12
3.2 Enzymatische Synthese	18
3.3 Umweltaspekte	21
4 Mikroarrays	23
5 Zielsetzung und Planung der Arbeit	29
6 Synthese von Thiooligosacchariden	31
6.1 Enzymatische Glykosylierung	32
6.1.1 Diskussion der spektroskopischen Daten der Akzeptorprodukte der GTFR und GTFA	35
6.2 Chemische Glykosylierung	39
6.2.1 Acetylierte Thiozucker	39
6.2.2 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 53, 55 und 56	41
6.2.3 Schutzgruppenfreie Thiozucker	41
6.2.4 Methyl-Thiooligosaccharide	42
6.2.5 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 65, 67, 69, 70 und 72	45
6.2.6 Allyl-Thiooligosaccharide	49
6.2.7 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 73 und 75	50
6.2.8 GlcNAc-Thiooligosaccharide	52
6.2.9 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 77, 78 und 80	53
6.2.10 Synthese an C-2 und C-3 tosylierter Glukosederivate	56
6.2.11 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 82, 85 und 86	57
6.2.12 Synthese S-(1,3) verknüpfter Glykoside	60
6.2.13 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 87, 88, 90 und 91	61
6.3 Potential der chemoenzymatischen Synthese	64
7 Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen auf Mikroarrays	68

7.1	Untersuchung auf Mikrotiterplatten	69
7.2	Untersuchung auf Mikroarrays	71
7.2.1	Anbindung säurefunktionalisierter Glykane auf Glaschips	71
7.2.2	Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 92, 93, 94 und 95	75
7.2.3	Anbindung aminofunktionalisierter Glykane auf Glaschips	77
7.2.4	Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 97, 99, 101, 103, 104, 105, 106, 107, 108 und 110	84
8	Synthese des tumorassoziierten Antigens Sialyl-Tn	88
8.1	Synthese von Sialyl-Tn	89
8.2	Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 112, 113 und 114	90
8.3	Synthese von thioverknüpftem Sialyl-Tn	93
8.4	Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 115, 117, und 118	94
9	Zusammenfassung	98
10	Allgemeine Methoden	104
10.1	Verwendete Geräte	104
10.2	Chromatographische Methoden	105
10.3	Verwendete Materialien für die Mikroarrays	105
11	Synthese der Thiooligosaccharide	107
11.1	Synthese und Isolierung der Akzeptorprodukte	107
11.1.1	Akzeptorprodukte der tosylierten Zucker	108
11.1.2	Synthese der acetylierten Thioglykoside: Allgemeine Vorschrift A.	112
11.1.3	Synthese der Thioglykoside: Allgemeine Vorschrift B.	112
11.1.4	Synthese der S-(1,6)-verknüpften Allyl-Glykoside	119
11.1.5	Synthese der S-(1,3)-verknüpften Allyl-Alloside	122
12	Anbindung funktionalisierter Linker	127
12.1	Synthese der säurefunktionalisierten Glukosederivate	127
12.2	Synthese der aminofunktionalisierten Kohlenhydrate: Allgemeine Vorschrift C	129
13	Versuche Mikroarrays	134
13.1	Versuche mit säurefunktionalisierten Zuckern	134
13.2	Anbindung der aminofunktionalisierten Glykane auf Nexterion-Slides	139
14	Synthese der Sialyl-Tn Derivate	143
14.1	Synthese des natürlichen Sialyl-Tn	143
14.2	Synthese von thioverknüpftem Sialyl-Tn	145
15	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	148

16 Literatur	151
17 Danksagung	161
18 Lebenslauf	162

I ALLGEMEINER TEIL

1 Einführung

Zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde das Humangenomprojekt abgeschlossen und somit die Gensequenzen des Menschen entschlüsselt.^[1, 2] Die Gene liefern die Bauanleitung für Proteine, welche Lebensprozesse als Bausubstanzen, Hormonsignale oder Enzyme beeinflussen. Eine bestimmte Klasse von Enzymen, sogenannte Glykosyltransferasen, sind für die Synthese der dritten Klasse von Biomolekülen, den Kohlenhydraten, verantwortlich. Diese umgeben die Oberfläche von Humanzellen, Viren, Bakterien und Parasitenzellen und beeinflussen den Signalaustausch der Zelle mit ihrer Umgebung.^[3] Kohlenhydrate sind weitaus komplexer als Nukleinsäuren oder Proteine aufgebaut. Bestimmte Proteine lesen die in den Kohlenhydraten gespeicherten Informationen, wodurch biologische Prozesse initiiert werden. Grippeviren nutzen Glykoproteine, um an Atemwegszellen anzudocken. Bei Entzündungen binden Proteine an Kohlenhydrate auf der Oberfläche weißer Blutkörperchen, die daraufhin ins entzündete Gewebe eindringen.^[4] Kleinste Unterschiede der Zucker auf roten Blutkörperchen sind für die Unterschiedlichkeit der Blutgruppen verantwortlich und bestimmen, ob ein transplantiertes Organ vom Körper angenommen wird. Und mithilfe bestimmter Zucker tarnen sich Krebszellen vor dem Immunsystem und können sich so ungestört vermehren.^[5] Unter Glykom versteht man die Gesamtheit aller in einer Zelle, in einem Gewebe oder in einem Organismus synthetisierten Glykane. Mit der Entschlüsselung des Glykoms sollen Therapien gegen Infektionskrankheiten und Krebs gefunden werden. Hierzu benötigt man große Bibliotheken von Kohlenhydratverbindungen, deren biologische Funktionen dann untersucht werden können. Das älteste kohlenhydratbasierte Medikament ist Heparin, welches seit 1940 als Antithrombosedmittel verwendet wird. Beispiele für Antibiotika, welche Kohlenhydrate enthalten, sind das Glykopeptid Vancomycin und das Polyketid Erythromycin.^[6] Erythropoetin (EPO) regt die Bildung roter Blutkörperchen an und wird bei Blutarmut und Dialysepatienten eingesetzt. Zur Verbesserung seiner Wirksamkeit wurde es gentechnisch modifiziert und somit die Anzahl der Zuckerseitenketten erhöht. Auch Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis wurden entwickelt. Viren, Bakterien und Parasiten tragen in der Regel andere Kohlenhydrate auf ihrer Oberfläche als menschliche Zellen, so dass mit Kohlenhydrat-Impfstoffen eine Immunantwort ausgelöst werden kann. Für Malaria konnte ein derartiger Impfstoff bei Studien an Mäusen bereits erfolgreiche Ergebnisse aufweisen.

Tumorzellen sind von anderen Zuckern ummantelt als gesunde Zellen.^[7] Erfolgreiche klinische Studien konnten mit Impfstoffen durchgeführt werden, welche die auf Tumorzellen vorkommenden Zucker enthalten. Die Erforschung der Glykomik steht noch relativ am Anfang und Wissenschaftler haben große Hoffnungen, dass nach der Erforschung des Genoms und Proteoms nun das Zeitalter der Glykomik angebrochen ist.

2 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate sind die häufigste in Naturstoffen vorkommende Gruppe. Ihre kleinste Einheit bezeichnet man als Monosaccharide mit der Bruttoformel $C_n(H_2O)_n$ ($n = 3-9$), weshalb sie von K. Schmidt als Kohlenhydrate (Hydrate des Kohlenstoffs) bezeichnet wurden.^[8] Ihre Monomere enthalten zwei bis acht Hydroxylgruppen. Man unterscheidet weiterhin zwei Klassen: Aldosen enthalten eine Aldehydgruppe und Ketosen eine Ketogruppe in der offenkettigen Form. Eine Hydroxylgruppe kann unter

Ringbildung mit der Aldehyd- oder Ketogruppe reagieren. Hierbei entsteht ein neues Chiralitätszentrum. Die zwei möglichen Formen werden als α - und β -Anomer bezeichnet. Durch Verknüpfen von Monosacchariden entstehen Oligosaccharide. Da Kohlenhydrate polyfunktionelle Moleküle sind, kann die Verknüpfung an einer der zahlreichen Hydroxylgruppen erfolgen. Die Verknüpfung kann vom anomeren Kohlenstoffatom ausgehend α - oder β -glykosidisch erfolgen, wodurch eine enorme strukturelle Vielfalt ermöglicht wird. Aus den in

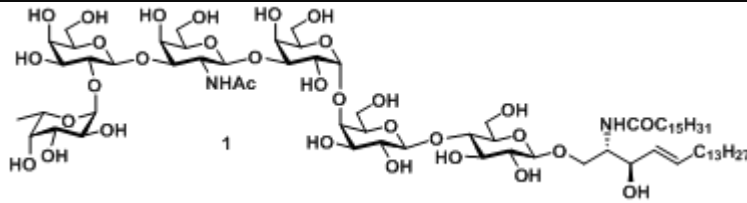
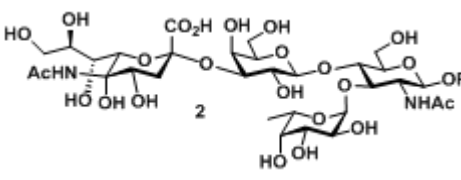
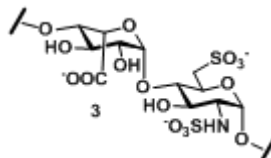
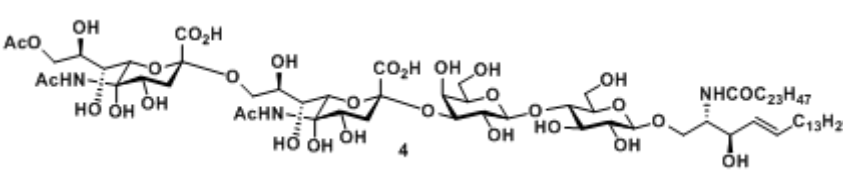
Menschen vorkommenden 9 Monosacchariden (siehe Abbildung 2-1) können theoretisch mehr als 15 Millionen Tetrasaccharide aufgebaut werden. Zu den Disacchariden zählen u. a. Saccharose, bei der Glukose α -1,2 mit

Fruktose und Fruktose β -2,1 mit Glukose verknüpft ist, Maltose, bei der Glukose α -1,4 mit Glukose verknüpft ist oder Laktose, bei der Galaktose β -1,4 mit Glukose verknüpft ist. Durch die Verknüpfung zahlreicher Monosaccharide entstehen makromolekulare Polysaccharide. Zu ihnen zählen Stärke, Glykogen, Cellulose und Chitin, die als Energiespeicher oder biologische Gerüstsubstanzen dienen. Durch Verknüpfung unterschiedlicher Monosaccharide entstehen lineare oder verzweigte Oligosaccharide, die bei zellulären Prozessen wichtige Funktionen erfüllen (siehe Tabelle 2-1). Sie kommen auf Zelloberflächen als Glykolipide oder Glykoproteine vor.

●	Glukose
○	Galaktose
●	Mannose
▶	Fucose
■	N-Acetylglukosamin
□	N-Acetylgalaktosamin
◆	Sialinsäure
☆	Xylose
◆	Glucuronsäure

Abbildung 2-1: Beim Menschen vorkommende Kohlenhydrate und ihre Symbole.

Tabelle 2-1: Auswahl biologisch bedeutsamer Oligosaccharide.

Struktur	Funktion
 <p>1</p>	Globo H (Tumorantigen)
 <p>2</p>	Sialyl-Lewis x (Adhäsion von Leukozyten)
 <p>3</p>	Heparin (Blutgerinnungshemmer)
 <p>4</p>	9-O-Acetyl GD3 (Melanom assoziiertes Gangliosid)

2.1 Glykoproteine

Mehr als 50% aller menschlichen Proteine sind glykosyliert.^[9] Die Glykosylierung ist somit die häufigste aber auch die komplexeste aller posttranslationalen Modifikationen. Glykoproteine bestehen aus N- oder O-glykosidisch an Proteine gebundenen Kohlenhydraten. Die N-glykosidische Verknüpfung erfolgt über eine Asparaginseitenkette eines Proteins, die O-glykosidische über eine Serin- oder Threoninseitenkette eines Proteins. Selten sind die O-glykosidischen Verknüpfungen mit Tyrosin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin als auch die C-glykosidische Verknüpfung mit Tryptophan.^[10]

Die Biosynthese von Glykanen erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat^[3] und lässt sich in drei Teile gliedern: Zunächst werden nukleotidaktivierte Zucker im

Zytoplasma synthetisiert. Eine Ausnahme stellt cmp-NeuAc (nukleotidaktivierte N-Acetylneuraminsäure, cmp: Cytidinmonophosphat) dar, welche im Zellkern synthetisiert wird. Im zweiten Schritt erfolgt der Transport der nukleotidaktivierten Zucker ins ER oder in den Golgi-Apparat. Dort werden im letzten Schritt die aktivierten Zucker auf ein Protein oder Glykan übertragen. Die Biosynthese von N-Glykanen beginnt im endoplasmatischen Retikulum. Eine an Dolicholphosphat gebundene Oligosaccharideinheit aus 14 Zuckern ($\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$) wird auf die Seitenkette Asn-X-Ser/Thr des Peptides übertragen, wobei X eine beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Obwohl N-Glykoproteine in zahlreichen unterschiedlichen Strukturen vorkommen, haben alle N-Glykane als gemeinsamen Vorläufer den $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ -Baustein. Direkt nach der Übertragung auf das entstehende Protein wird die Saccharideinheit mithilfe verschiedener Glykosidasen durch Entfernung dreier endständiger Glukose- (n, l und m) und einer Mannoseeinheit (i oder k) auf 10 Zuckereinheiten verkürzt (siehe Abbildung 2-2 und Abbildung 2-3).

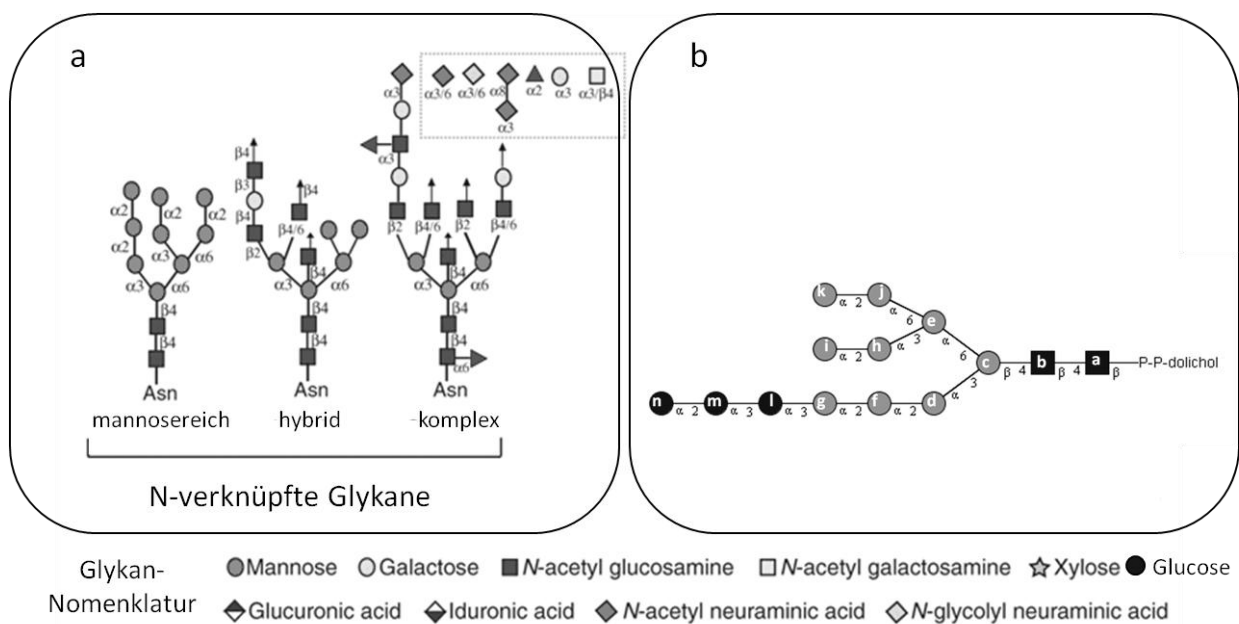


Abbildung 2-2: a: Klassen von N-Glykanen. b: An Dolicholdiphosphat gebundenes Oligosaccharid, welches im endoplasmatischen Retikulum auf das entstehende Protein übertragen wird.

Erst im Golgi-Apparat entsteht durch das Zusammenspiel von Glykosidasen und Glykosyltransferasen die enorme Diversität der N-Glykane. Man unterscheidet drei Klassen von N-Glykanen: komplexe, mannosereiche und hybridartige (siehe Abbildung 2-2). Die komplexen N-Glykane werden nach ihrer Überführung in den Golgi-Apparat zuerst gekürzt

und anschließend erweitert. Die Erweiterung erfolgt mit Zuckern wie N-Acetylglukosamin, Galaktose, Sialinsäure und in wenigen Fällen auch mit Fukose. Den mannosereichen N-Glykanen werden im Golgi-Apparat lediglich zwei N-Acetylglukosamin- und zahlreiche Mannosereste angehängt. Hybridartige Strukturen vereinigen die strukturellen Eigenschaften der beiden erstgenannten Klassen. Gemeinsam ist allen N-Glykanen eine Pentasaccharid-Core-Struktur, welche aus 2 N-Acetylglukosamin- und 3 Mannoseeinheiten besteht (siehe Abbildung 2-3).^[3]

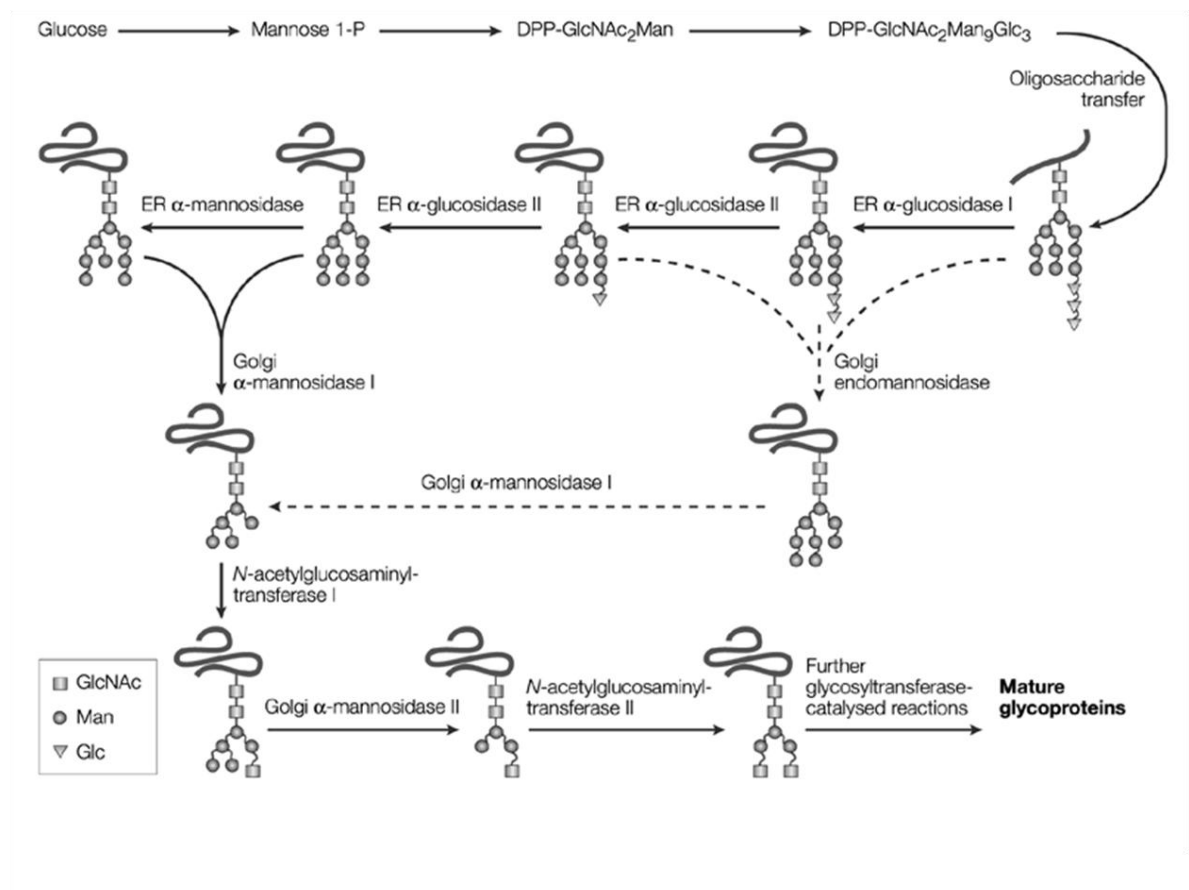


Abbildung 2-3: Biosynthese von N-Glykanen.^[11]

Die N-Glykosylierung von Proteinen beeinflusst sowohl deren Struktur als auch zahlreiche biologische Funktionen. N-Glykane sorgen für eine Stabilisierung der Proteinkonformation. Indem sie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptidrückgrat ausbilden, beeinflussen sie die Faltung von Proteinen und erhöhen deren Löslichkeit.^[12, 13] Da selbst kleine Glykane aus der Oberfläche von Glykoproteinen herausragen, hindern sie Proteasen daran, das Peptidrückgrat anzugreifen.^[14] Glykane sorgen außerdem dafür, dass Proteine zu bestimmten

Targets in und außerhalb der Zelle transportiert werden. Für die Vermittlung von Erkennungsprozessen sind sie aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt prädestiniert, wie z.B. bei der Anbindung von Viren an Glykoproteine der Wirtszelle^[15]. Protein-Glykan Wechselwirkungen beeinflussen auch die Entwicklung und Differenzierung von Zellen wie beispielsweise Nervenzellen.^[16] Auch die Aktivität von Zytokinen wird über Glykosylierung gesteuert.^[17]

Die Biosynthese der O-Glykane verläuft über keinen einheitlichen Weg. Im Menschen kommen 7 Typen von O-Glykanen vor (siehe Tabelle 2-2), welche durch den mit dem Protein verknüpften Zucker und die Stereochemie seiner Verknüpfung bestimmt werden. Der verbreitetste Typ sind Muzine, bei denen die Verknüpfung an das Peptid über N-Acetylgalaktosamin, das sogenannte Tn-Antigen, erfolgt.^[3] Muzine lassen sich auf 8 Core-Strukturen zurückführen, die durch den zweiten Zucker vom reduzierenden Ende aus gesehen bestimmt werden (siehe Abbildung 2-4). Durch die zahlreichen Verknüpfungsmöglichkeiten existiert eine enorme Vielzahl muzinartiger O-Glykane, welche an zahlreichen biologischen Prozessen mitwirken (siehe Tabelle 2-3). Die zweite Klasse sind Glykosaminoglykane. Proteoglykane sind Proteine, welche Glykosaminoglykane enthalten. In der Regel sind Glykosaminoglykane über ein Tetrasaccharid (GlcA β 1–3Gal β 1–3Gal β 1–4Xyl) an das Protein gebunden. Sie bestehen aus langen, unverzweigten sich wiederholenden Disaccharideinheiten, welche aus einem Aminozucker und einem Ester der Uronsäure (meist Glucuronsäure) bestehen. Bei Heparin und Heparansulfat werden die Disaccharideinheiten durch Sulfatierung zusätzlich modifiziert. Die verbleibenden fünf Typen von O-Glykanen kommen in geringerer struktureller Vielfalt vor und weisen meist nur eine Konformation auf. Die Biosynthese der O-Glykane beginnt nach der Faltung der Proteine im ER oder im Golgi-Apparat. Die nukleotidaktivierten Zucker müssen dafür zunächst vom Zytosol in den Lumen des ER oder des Golgi-Apparates transportiert werden. Der Transport der nukleotidaktivierten Zucker in das ER oder in den Golgi-Apparat kann auf zwei Arten erfolgen, durch welche die Zucker die Lipiddoppelschicht der Membran durchdringen können.

Tabelle 2-2: Typen von O-verknüpften Glykanen im Menschen. Die Symbole sind in Abbildung 2-1 erklärt.

Typ	Struktur
Muzin-Typ	<p>R — _α — Ser/Thr</p>
Glykosaminoglykane (GAG)	<p>R — _{β 3} — _{β 3} — _{β 4} — _β — Ser</p>
O-verknüpftes GlcNAc	<p> _β — Ser/Thr</p>
O-verknüpfte Gal	<p> _{α 2} — _β — Lys</p>
O-verknüpfte Man	<p> _{α 3} — _{β 4} — _{β 2} — _α — Ser/Thr</p>
O-verknüpfte Glc	<p> _{α 3} — _{α 3} — _β — Ser</p>
O-verknüpfte Fuc	<p> _{β 3} — _α — Ser/Thr</p> <p> _{α 6} — _{β 4} — _{β 3} — _α — Ser/Thr</p>

Bei der ersten Art werden Mannose bzw. Glukose ins ER transportiert. Hierfür binden sie an Dolicholphosphat, passieren die Membran des ER und werden dort durch spezifische Glykosyltransferasen auf Glykane übertragen.^[18] Beim zweiten Mechanismus erfolgt der Transport über spezifische Nukleotidzucker-Transporter. Diese sorgen dafür, dass jeder Zucker zur entsprechenden Glykosyltransferase transportiert wird. Der Transfer der nukleotidaktivierten Zucker auf das Glykan bzw. Protein erfolgt über spezifische Glykosyltransferasen.

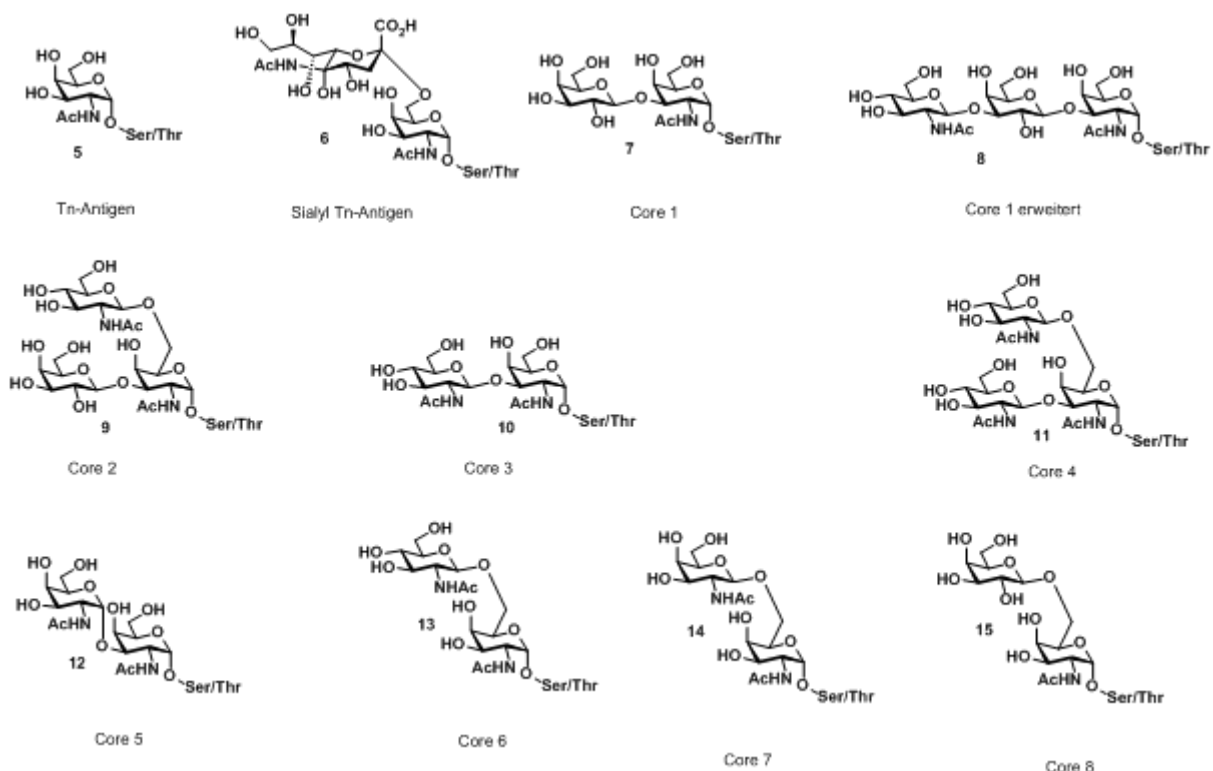


Abbildung 2-4: Kernstrukturen des Mucin-Typs.

Die für die O-Glykan-Synthese zuständigen Glykosyltransferasen befinden sich nahezu ausschließlich im Golgi-Apparat und sind dort membrangebunden. Obwohl sie ähnliche Reaktionen katalysieren, haben sie nur geringe Sequenzhomologie. Ihre Spezifität wird sowohl durch den Zucker als auch durch die Peptidsequenz beeinflusst. Manche Glykosyltransferasen sind spezifisch für eine Klasse von O-Glykanen, während andere bei der Synthese verschiedener Typen von O-Glykanen beteiligt sind. In der Regel sind diejenigen Glykosyltransferasen, welche für die Übertragung des Glykans auf das Protein und für die

Synthese der muzinartigen Core-Strukturen zuständig sind, spezifisch für diese Klassen, während die für die Verlängerung und Verzweigung von Glykanen zuständigen Glykosyltransferasen ein breites Spektrum an Glykanen synthetisieren.^[19] Eine Ausnahme stellt die Biosynthese von Glykosaminoglykanen dar. Die hierbei beteiligten Glykosyltransferasen sind in der Regel spezifisch und nicht bei der Biosynthese anderer Glykotypen beteiligt. Außerdem erfolgt die Verlängerung der Glykosaminoglykane an einem einheitlichen Tetrasaccharid, welches an das Protein gebunden ist. Allen Glykoproteinen gemeinsam ist, dass nur auf der Proteinoberfläche befindliche Serin- und Threoninreste glykosyliert werden, da die O-Glykosylierung erst nach der Faltung der Proteine stattfindet.^[20]

Tabelle 2-3: Auswahl muzinartiger Glykoproteine und Angabe ihrer biologischen Funktionen. Lck ist eine Tyrosinkinase, die durch CD45 dephosphoryliert und somit aktiviert wird. Homing bezeichnet die gewebespezifische Rezirkulation von Leukozyten aus anderen (nicht lymphatische) Organen.

Glykoprotein	Biologische Funktion	Rolle der O-verknüpften Glykane
MUC1	Tumorantigen	veränderte Glykane auf Tumorzellen
MUC2	Darmhomöostase	Schutzfunktion
Interleukin-2	Zytokin	Regulierung der Serum-Halbwertszeit
Gonadotropin	hypophysäres Hormon	steuert Wachstum von Keimdrüsen
CD45	Tyrosinphosphatase	Regulierung von Lck Signalen
GlyCAM-1	Homing von Leukozyten	Liganden für L-Selektin
PSGL-1	Homing von Leukozyten	Liganden für P-Selektin
Ebola GP	virales Glykoprotein	notwendig für Zytotoxizität

Die O-Glykosylierung beeinflusst sowohl die Struktur von Proteinen als auch ihre Stabilität. Es konnte gezeigt werden, dass O-Glykane die Sekundär-^[21], Tertiär-^[22] und Quartärstruktur^[23] von Proteinen verändern können. Wie bei der N- wird auch bei der O-Glykosylierung die thermische Stabilität von Proteinen als auch ihre Resistenz gegenüber Proteasen erhöht.^[24] Zahlreiche biologische Prozesse werden ebenfalls durch O-Glykane gesteuert. Die immunologische Erkennung der Blutgruppen erfolgt über die ABO-Blutgruppenantigene, welche O-Glykane sind. Außerdem werden O-Glykane durch den MHC-Komplex^[25] oder Antikörper^[26, 27] erkannt. O-Glykane vermitteln die Erkennung zwischen Proteinen, indem sie durch kohlenhydratbindende Proteine, sogenannte Lektine, erkannt werden. Hierdurch werden Prozesse wie Zellwachstum, Apoptose oder Zell-Zell-Wechselwirkungen oder die Befruchtung von Eizellen beeinflusst.^[28] Interaktionen zwischen Glykanen und Signalmolekülen oder Proteinen werden durch Glykosaminoglykane induziert. Die biologische Aktivität von Proteinen und Signalmolekülen kann dadurch sowohl zu- als auch abnehmen.^[29] Desweiteren sind O-Glykane von Bedeutung für die Expression bestimmter Glykoproteine. Es konnte gezeigt werden, dass Glycophorin A nur in glykosylierter Form auf Zelloberflächen exprimiert wird.^[30]

3 Synthese von Kohlenhydraten

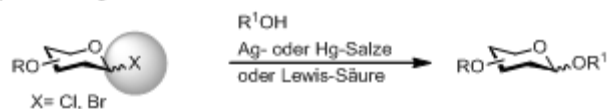
3.1 Chemische Synthese

Die Synthese von Kohlenhydraten kann grundsätzlich auf zwei Wegen erfolgen: durch Erweiterung am reduzierenden Ende oder durch Erweiterung am nicht-reduzierenden Ende. Um die Reaktivität am anomeren Zentrum zu erhöhen, müssen Abgangsgruppen eingeführt werden. Außerdem müssen die Hydroxylgruppen mit Schutzgruppen versehen werden, damit es nicht zu Nebenreaktionen kommen kann. Es gibt verschiedene Faktoren, welche die chemische Synthese von Kohlenhydraten beeinflussen. Hierzu zählen vor allem die Eigenschaften der Abgangsgruppe wie ihre Reaktivität, Stabilität und die Bedingungen, unter denen sie aktiviert wird. Ein weiterer entscheidender Faktor ist die Kontrolle der Stereoselektivität. Bei den meisten Glykosylierungen erhält man Anomerengemische. Die Stereoselektivität kann durch geeignete Nachbargruppen und die Temperatur bei der Reaktion kontrolliert werden.^[31] Werden Alkyl oder Benzylgruppen an C-2 oder 2-Desoxyzucker verwendet, wird aufgrund des anomeren Effekts (ein stereoelektronischer Effekt basierend auf Wechselwirkungen zwischen dem freien Elektronenpaar des Ringsauerstoffatoms und dem antibindenden Orbital der Wasserstoffs am anomeren Zentrum) bevorzugt das α -Anomer gebildet. Werden Substituenten gewählt, die sich bei der Bildung des Übergangszustandes beteiligen können (z.B. Ester, Phenylsulfonyl oder Phenylselenyl), entsteht bevorzugt das 1,2-*trans* konfigurierte Produkt.^[32] Es existieren zahlreiche Glykosylierungsmethoden, die sich durch die Art der Abgangsgruppe unterscheiden (siehe Abbildung 3-1). Am längsten bekannt ist die Koenigs-Knorr-Methode, welche bereits 1901 beschrieben wurde.^[33] Hierbei wird ein Glykosylchlorid oder -bromid mit einem Akzeptor unter Aktivierung eines Schwermetallions, vorwiegend Silber oder Quecksilber, umgesetzt. Aus α -Glykosylhalogeniden bilden sich β -Glykoside. Doch aufgrund der zu geringen Reaktivität vieler Akzeptoren muss die Aktivität der Donoren durch Zugabe von Lewis-Säuren erhöht werden, wodurch der Mechanismus in Richtung S_N1 -Substitution gelenkt wird. Die Kontrolle der Stereochemie erfolgt durch die geschickte Wahl von Lösungsmittel, Temperatur und Schutzgruppen. Die Nachteile der Koenigs-Knorr-Methode sind die drastischen Bedingungen, welche zur Synthese der Halogenide erforderlich sind. Hinzu kommt ihre geringe thermische Stabilität, wodurch die Halogenide bevorzugt *in situ* und bei tiefen Temperaturen erzeugt werden. Bei großen Ansätzen (>100 kg) müssen die hohen Kosten und die Toxizität der

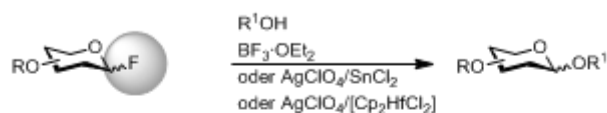
Schwermetallsalze berücksichtigt werden. 1981 zeigten Mukayama et al., dass die weniger reaktiven Glykosylfluoride ebenfalls als Donoren eingesetzt werden können.^[34] Sie können durch Lewis-Säuren^[35], Silbersalze oder verschiedene Metallocene aktiviert werden.^[36, 37] Aufgrund ihrer erhöhten Stabilität im Vergleich zu anderen Halogeniden können Glykosylfluoride problemlos chromatographisch aufgereinigt werden und haben so Einsatz in zahlreichen Synthesen gefunden.^[38, 39] Da sie für komplexe Synthesen nicht reaktiv genug sind, wurde von Suzuki et al. die Methode erweitert, indem $\text{Cp}_2\text{HfCl}_2/\text{AgClO}_4$ zur Aktivierung verwendet wird.^[40] Eine sehr vielseitige und in zahlreichen Synthesen verwendete Methode ist die Glykosylierung nach Schmidt^[41]. Hierbei wird ein Trichloracetimidat als Abgangsgruppe verwendet. Diese Abgangsgruppe bietet die Möglichkeit, große Oligosaccharide auf Aglykone zu übertragen, wie beispielsweise in der Synthese von Gangliosiden.^[42] Die Aktivierung erfolgt durch Lewis-Säuren wie Trimethylsilyltriflat (TMSOTf), Bortrifluoridetherat ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), Triethylsilyltriflat (TESOTf) oder Silbertriflat (AgOTf)^[43]. Da Trichloracetimide auch in polaren Lösungsmitteln reagieren, ist die Glykosylierung ungeschützter Akzeptoren möglich. Durch geeignete Wahl der Nachbargruppe an C-2 ist eine stereoselektive Synthese in guten Ausbeuten möglich. Da die Trichloracetimide zudem in hohen Ausbeuten darstellbar und einfach handzuhaben sind, wurde die Trichloracetimidatmethode in zahlreichen Naturstoffsynthesen wie z.B. bei Calicheamicin^[44, 45], Macroviracin D^[46] oder komplexen Gangliosiden^[47, 48] eingesetzt. Auch Thioglykoside können als Glykosyldonoren verwendet werden.^[49] Sie sind einfach zu synthetisieren, stabil und durch Elektrophile oder Oxidationsmittel aktivierbar. Sie können leicht in Sulfoxide umgewandelt werden, die als milde Glykosyldonoren dienen.^[50] Glykale sind 1,2-geschützte Zucker. Ihr Einsatz bietet die Möglichkeit, den Substituenten an C-2 zu modifizieren. Sie werden in der Gegenwart von Elektrophilen aktiviert und häufig in der Synthese von 2-Desoxyzuckern verwendet.^[51] Phosphate^[52] und Phosphite^[53], als auch Pentenylglykoside^[54] können ebenfalls als Glykosyldonoren eingesetzt werden.

Da Kohlenhydrate multifunktionelle Verbindungen sind, müssen die freien Hydroxylgruppen bei Glykosylierungen geschützt werden. Häufig werden Kohlenhydrate als Acetale oder Orthoester durch säurekatalysierte Kondensation mit Aldehyden oder Ketonen geschützt. Die so erhaltenen Acetale können anschließend selektiv gespalten werden, so dass nur eine bestimmte Hydroxylgruppe entschützt wird.

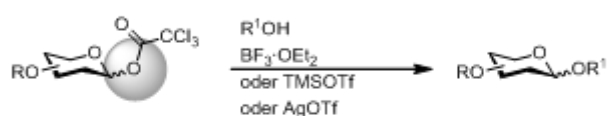
a) Die Koenigs-Knorr-Methode



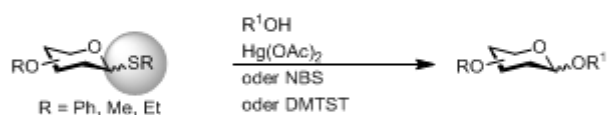
b) Die Glykosylfluorid-Methode



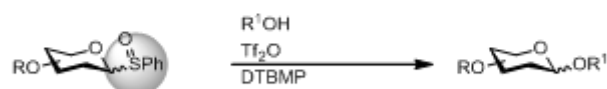
c) Die Trichloracetimidatmethode



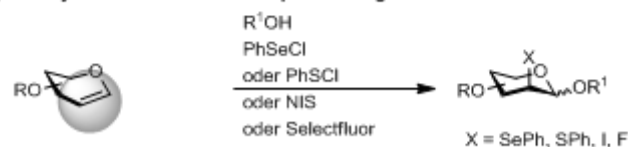
d) Die Thloglycosid-Methode



e) Die Sulfoxid-Methode



f) Die Glycal-Methode mit elektrophilen Reagentien



g) Die Glycal-Methode mit DMDO

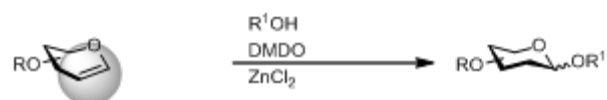


Abbildung 3-1: Übersicht gängiger Glykosylierungsmethoden. (NBS = *N*-Bromsuccinimid, DMTST = (Dimethylthio)methylsulfoniumtriflat, DTBMP = 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin, NIS = *N*-Iodsuccinimid, DMDO = Dimethyldioxiran)

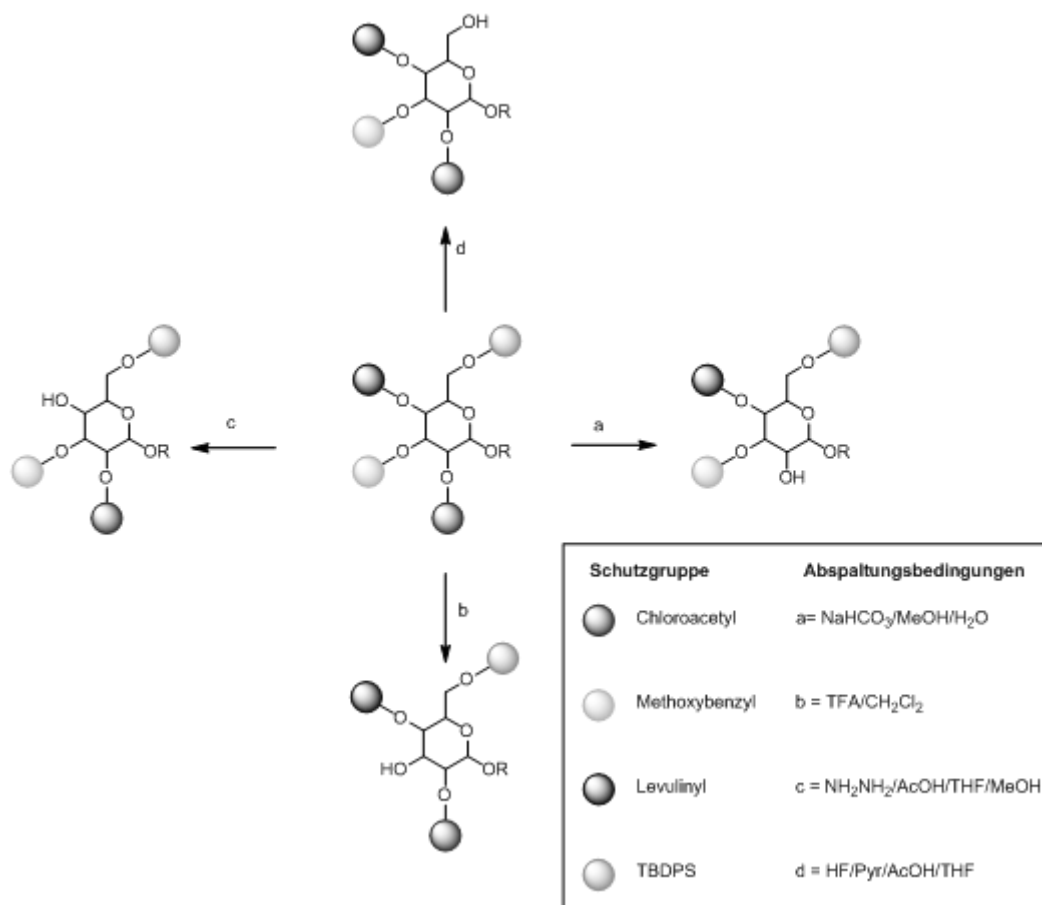


Abbildung 3-2: Orthogonale Schutzgruppenstrategie. (TFA= Trifluoressigsäure, Pyr = Pyridin, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl)

Eine sehr elegante Möglichkeit, die Hydroxylgruppen selektiv zu schützen bzw. zu entschützen, ist der Einsatz orthogonaler Schutzgruppen, die unabhängig voneinander bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen entfernt werden können. Hierbei sind folgende Gruppen üblich: A. Chloroacetyl (basisch), B: Methoxybenzyl (oxidativ), C: Levulinyl (Hydrazin) und D: TBDPS (Fluorid). Diese können unabhängig voneinander abgespalten werden, so dass jede Hydroxylgruppe einzeln entschützt und anschließend mit einem entsprechenden Glykosyldonor umgesetzt werden kann (siehe Abbildung 3-2).

Es existieren verschiedene Ansätze, welche die Synthese von Kohlenhydraten effizienter machen sollen. Eine Methode ist die Verwendung von Polyethylenglykolmonomethylether (MPEG) als Träger.^[55] MPEG ist ein in verschiedenen Lösungsmitteln lösliches Polymer, wodurch die Reaktionen an „fester Phase“ in Lösung ablaufen und so über NMR-Spektroskopie oder Massenspektrometrie verfolgt werden können.^[56, 57] MPEG fällt bei

Zugabe von *tert*-Butylmethylether aus, so dass die Aufarbeitung erheblich erleichtert wird, da das polymergebundene Produkt leicht von den anderen Reagenzien in Lösung abgetrennt werden kann. Die Eintopfsynthese basiert auf der Reaktivität einzelner Kohlenhydrat-Bausteine. Hierdurch soll die Syntheseplanung automatisiert werden können.^[58] Die Reaktivität wird durch die Abgangsgruppen der einzelnen Bausteine bestimmt. Die Synthese des gewünschten Oligosaccharids kann nun entweder durch sukzessives Hinzufügen der Bausteine oder durch gleichzeitiges Hinzufügen aller Bausteine zur Reaktionslösung erfolgen. Begrenzt ist die Methode durch das Auffinden von Bausteinen abgestimmter Reaktivitäten. Der Vorteil der Eintopf-Strategie liegt darin, dass die Aufreinigungsschritte der Zwischenprodukte wegfallen. Jedoch ist eine gründliche Aufreinigung des Endproduktes notwendig, da Nebenprodukte während der einzelnen Syntheseschritte nicht entfernt werden. 2001 beschrieben Wong et al. die Eintopfsynthese des Hexasaccharids Globo H.^[59] Globo H wurde als Antigen auf Darm-, Eierstock-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, Prostata- und Brustkrebszellen gefunden.^[60-63] Die Reaktivitäten der Bausteine wurden durch feines Abstimmen elektronenziehender und –schiebender Gruppen bestimmt. Diese Synthese beinhaltete zwei Eintopfreaktionen (Produkte **19** und **23**) welche durch Entschützungschritte getrennt wurden, um die Selektivität der Reaktionen zu erhöhen (siehe Abbildung 3-3). Die Festphasensynthese bietet zahlreiche Vorteile gegenüber einer Synthese in Lösung. Da das Produkt an die feste Phase gebunden ist, können die Reagenzien einfach abfiltriert werden. Die einzelnen Bausteine und Reagenzien werden meist im Überschuss eingesetzt, wodurch die Ausbeute erhöht wird. Durch den Wegfall aufwendiger Aufarbeitungsschritte kann die Synthese zudem automatisiert und beschleunigt werden. Der Auswahl des Trägers kommt eine entscheidende Rolle zu, da seine lösungsmittelabhängigen Schwelleigenschaften und sein sterischer Raumbedarf die Reaktivität als auch die Stereochemie der Reaktion beeinflussen können.^[6] Als Träger haben sich verschiedene Harze ausgezeichnet, welche auch in der Peptidsynthese üblich sind. Aufgrund ihrer chemischen Stabilität werden Polystyrolharze (PS) am häufigsten eingesetzt. Eine Alternative sind Merrifield PS-Harze^[64], welche für eine große Bandbreite von Reaktionen geeignet sind. Bessere Schwelleigenschaften weisen Polyether Harze auf, welche auf Polyethylenglykol (PEG) basieren.^[65] Hierbei sind sogar enzymatische Synthesen aufgrund der größeren Porengröße und der Kompatibilität mit Wasser möglich.

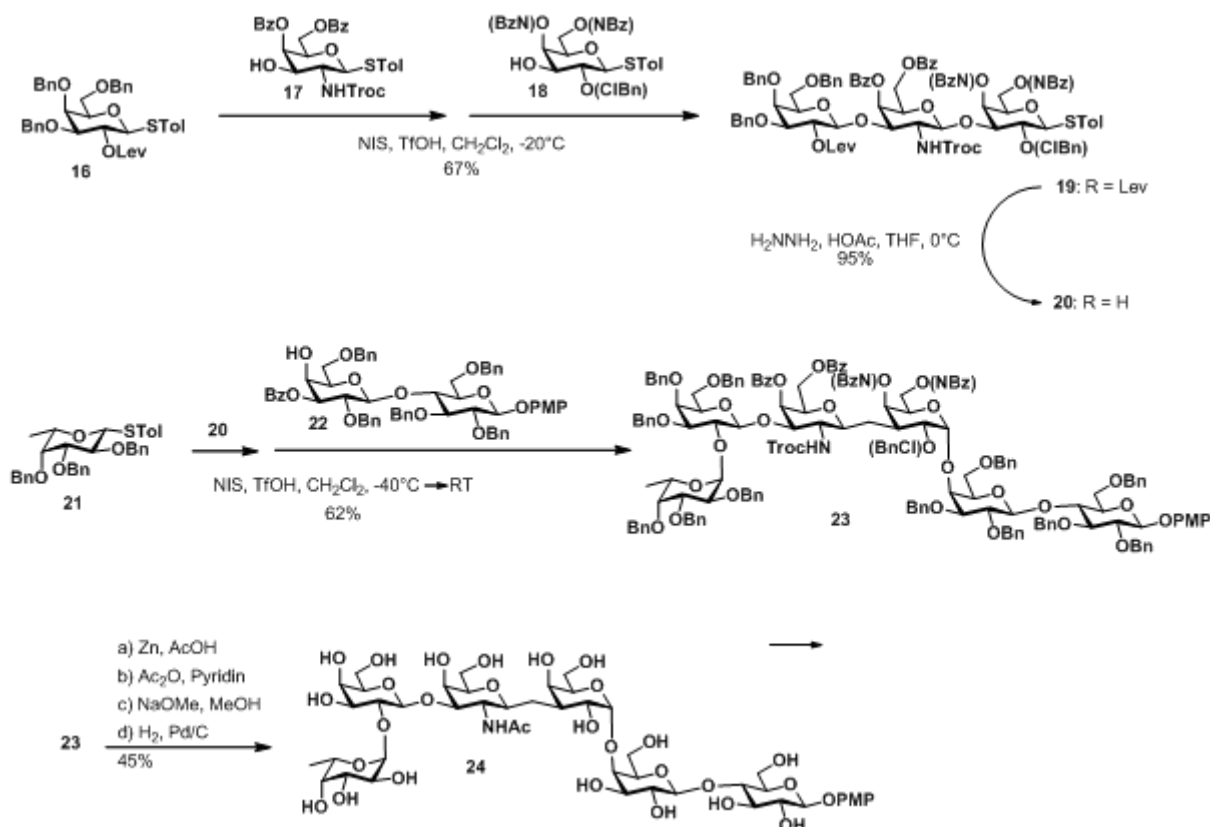


Abbildung 3-3: Eintopfsynthese von Globo H. (Tol = Toluyl, Lev = Levulinyll, Troc = 2,2,2-Trichloroethoxycarbonyl, Bn = Benzyl, Bz = Benzoyl, PMP = 4-Methoxyphenyl, NIS = *N*-Iodsuccinimid)

Der Linker, welcher Kohlenhydrat und Harz miteinander verbindet, bestimmt, welche weiteren Schutzgruppen bei der Synthese verwendet werden. Der Linker kann sowohl am anomeren Zentrum als auch an die anderen Hydroxylgruppen gebunden sein. Er kann zum Ende der Synthese entweder abgespalten oder in andere funktionelle Gruppen, Schutzgruppen oder in eine Abgangsgruppe umgewandelt werden.^[66-68]

Eine Automatisierung der Kohlenhydratsynthese wäre ein enormer Fortschritt, um den Bedarf strukturell definierter Kohlenhydrate für eine systematische Erforschung ihrer biologischen Funktionen zu decken. Für eine automatisierte Synthese in Lösung, welche nach der Methode der Eintopfsynthese abläuft, entwickelten Wong et al. ein Computerprogramm unter dem Namen Optimizer, welches versucht, die für eine Oligosaccharidsynthese benötigten Bausteine zu berechnen.^[68] Dazu greift Optimizer auf eine Datenbank zurück, in der die Reaktivitäten verschiedener Bausteine gespeichert sind. Bei der Synthese werden die Bausteine mit abnehmender Donoraktivität vom nicht-reduzierenden Ende zum reduzierenden Ende des

wachsenden Oligosaccharids miteinander verknüpft. Ein auf Festphasensynthese basierender Synthese-Automat für Kohlenhydrate wurde von Seeberger et al. entwickelt.^[69] Hierfür wurde ein Peptidsyntheseautomat modifiziert. Da die meisten Glykosylierungen bei niedrigen Temperaturen ablaufen, wurde der Automat an einen temperaturkontrollierten Reaktor gekoppelt. Als Synthesebausteine wurden Glykosylphosphate und –trichloracetimide verwendet. Seeberger et. al. veröffentlichten 2002 die Synthese des GPI Malaria-Toxins^[70], welches als Proteinkonjugat in einem Impfstoff bei Mäusen die Sterblichkeitsrate drastisch reduzieren konnte.^[71] Zur Synthese wurde ein kombinierter Ansatz aus automatisierter Festphasen-Synthese und klassischer Synthese in Lösung verwendet. Aufgrund der schwierigen α -Verknüpfung zweier Fragmente wurde ein Fragment in Lösung synthetisiert und anschließend mit dem auf fester Phase synthetisierten zweiten Fragment in Lösung verknüpft (siehe Abbildung 3-4).

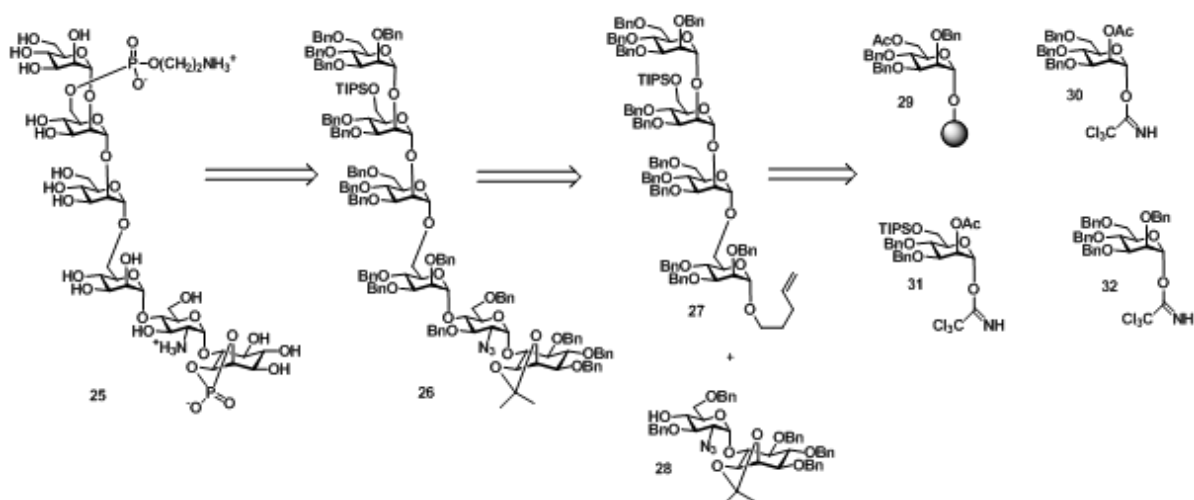


Abbildung 3-4: Retrosynthese des GPI Malaria-Toxins.^[70] (TIPS = Triisopropylsilyl)

3.2 Enzymatische Synthese

Auf chemischem Wege lassen sich zwar nahezu beliebig komplexe Oligosaccharide synthetisieren, jedoch erfordern die Synthesen einen hohen synthetischen Aufwand. So müssen in der Regel Schutzgruppen an bestimmten Stellen der Syntheseroute eingeführt und wieder entfernt werden. Zur Aktivierung der Bausteine sind Abgangsgruppen erforderlich, welche durch umweltbelastende Katalysatoren und energieaufwändige Reaktionsbedingungen aktiviert werden. In der Natur werden Glykane mithilfe von Enzymen aufgebaut. Isolierte Enzyme oder auch Zellen können auch im Labor zur Synthese von Oligosacchariden

eingesetzt werden.^[72] Die enzymatische Synthese verläuft unter milden Reaktionsbedingungen und häufig stereo- und regioselektiv, wodurch keine Schutzgruppen notwendig sind. Zur Synthese von Oligosacchariden werden drei Klassen von Enzymen verwendet: Glykosidasen, Glykosynthasen und Glykosyltransferasen. Glykosidasen sind Enzyme, welche *in vivo* Oligosaccharide trimmen. *In vitro* können sie Oligosaccharide synthetisieren, wenn der Akzeptor ein besseres Nukleophil als Wasser ist. Sie sind jedoch selten regioselektiv und die mit ihnen erzielte Ausbeute ist geringer als mit Glykosyltransferasen. Dafür sind sie stabil und können in einigen organischen Lösungsmitteln verwendet werden.^[73-76] Sie sind wie auch die benötigten Glykosyldonoren u. a. aus Bakterien bzw. Pilzen gut zugänglich. Die erste *in vitro* Synthese von Cellulose, die nicht über einen Biosyntheseweg verlief, gelang 1991 mithilfe der Glykosidase Cellulase.^[77]

Glykosynthasen sind durch Protein-Engineering modifizierte Glykosidasen, bei denen katalytische Nukleophile durch Mutation gegen neutrale Aminosäuren (Glycin, Alanin oder Serin) ersetzt werden. Die modifizierten Enzyme verlieren dadurch ihre hydrolytische Aktivität und erlangen die Fähigkeit, glykosidische Verknüpfungen zu bilden, wobei vorwiegend Glykosylfluoride als Substrat verwendet werden. Die erste Glykosynthese wurde von Withers et al. eingesetzt.^[78] Die Glu358Ala Mutante einer β -Glukosidase aus *Agrobacterium sp.* fungierte als β -Glukosynthese und es konnten Oligosaccharide in Ausbeuten über 60% erzielt werden. Das Spektrum der Glykosynthasen konnte auf β -Galaktosynthasen^[79], β -Mannosynthasen^[80] und α -Glukosynthasen^[81] erweitert werden. Auch Thiooligosaccharide konnten durch Umsetzung modifizierter Substrate mit Glykosynthasen erhalten werden.^[82]

Glykosyltransferasen synthetisieren Glykokonjugate in Zellen, insbesondere in Säugetierzellen^[83], sowie Zellwand-Polysaccharide in Pflanzen, Pilzen und Bakterien. Glykosyltransferasen lassen sich in zwei Klassen einteilen: Leloir und Nicht-Leloir Glykosyltransferasen. Während Leloir-Glykosyltransferasen nukleotidaktivierte Zucker als Donoren benötigen, verwenden Nicht-Leloir Glykosyltransferasen Glykosylphosphate oder Glykoside als Donoren. Leloir-Glykosyltransferasen katalysieren die Übertragung eines Glykosyldonors auf die Hydroxylgruppe eines anderen Zuckers oder auf eine Serin-, Threonin- oder Asparaginseitenkette eines Proteins.^[84] Sie sind im Allgemeinen substratspezifisch, jedoch tolerieren sie kleine Modifikationen an Donor und Akzeptor.^[85, 86]

Zur Aktivierung ist ein Metallion (Mn^{2+} , Mg^{2+}) als Cofaktor notwendig. Ihre Verwendung *in vitro* wird durch ihre eingeschränkte Verfügbarkeit erschwert. Sie kommen nur in niedrigen Konzentrationen im Gewebe vor, sind häufig membrangebunden oder -assoziiert und somit nur schwer zu isolieren, zumal sie meist instabil sind. Auch die rekombinante Expression ist mit hohen Kosten verbunden, da die Glykosyltransferasen in nur sehr geringen Ausbeuten produziert werden. Die large-scale Produktion ist somit stark eingeschränkt. Eine hohe Expression von Säugetier-Glykosyltransferasen in Insekten-, Pflanzen- und Bakterienzellen ist außerdem schwierig. Bakterielle Glykosyltransferasen können in *E. coli* in großen Mengen exprimiert und mit ihnen menschliche Oligosaccharide synthetisiert werden.^[87]

Die nukleotidaktivierten Zucker, welche als Glykosyldonoren benötigt werden, sind zwar kommerziell verfügbar, jedoch ausschließlich zu hohen Kosten. Ein System zur *in situ* Generierung von nukleotidaktivierten Zuckern wurde von Wong und Whitesides entwickelt.^[88] Dadurch wird die Konzentration des aktivierten Zuckers gering gehalten und sein inhibitorischer Effekt auf die Glykosyltransferase umgangen. Für die Biosynthese menschlicher Oligosaccharide sind lediglich 9 Monomerbausteine erforderlich. Diese werden mit einer Kinase in 1-Phosphat-zucker umgewandelt. Leloir fand heraus, dass durch Umsetzung von Glukose-1-phosphat mit Uridintriphosphat (UTP) ein energiereicher Donor (Uridindiphosphat-Glukose) entstand, welcher für die Synthese von Glykokonjugaten verwendet wird und wurde für diese Entdeckung im Jahre 1970 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.^[89-92] Inzwischen sind die Biosynthesewege aller 9 Monosaccharidbausteine bekannt. Diese werden als primäre Zuckernukleotide bezeichnet, da sie direkt aus den Glykosyl-1-phosphaten unter Umsetzung mit einem Nukleosidtriphosphat und einer Nukleosid-Transferase/Pyrophosphorylase generiert werden.^[93] Andere Nukleotidzucker werden aus den primären Zuckernukleotiden synthetisiert und folglich als sekundäre Zuckernukleotide bezeichnet.^[94]

Einer weitere Klasse von Kohlenhydrat-synthetisierenden Enzymen sind bakterielle Glukansucrasen, sogenannte Nicht-Leloir Glykosyltransferasen. Obwohl sie strukturverwandt mit Glykosidasen sind, katalysieren sie die Synthese von Kohlenhydraten, während Glykosidasen die Hydrolyse von Kohlenhydraten katalysieren. Obwohl es einige Hypothesen gibt, welche strukturellen Details für ihre gegensätzlichen Funktionen verantwortlich sind, sind diese noch nicht eindeutig geklärt. Es lassen sich zwei funktionelle Domänen

unterscheiden: eine hochkonservierte katalytische Domäne, welche für die Bindung von Saccharose und die Übertragung der Glukose zuständig ist, und eine C-terminale Domäne, durch welche das Glukan gebunden wird.^[95] Glukansucrasen werden von Milchsäurebakterien wie *Streptococcus*, *Lactobacillus* und *Leuconstoc. spp* produziert.^[95, 96] Glukansucrasen verwenden Saccharose als Substrat und synthetisieren Glukosepolymere mit hohem Molekulargewicht. Die Bindungsenergie der Saccharose ist deutlich höher als die anderer Disaccharide und somit die Triebkraft für die Synthese der Glukosepolymere. Abhängig von der jeweiligen Glukansucrase können unterschiedliche Glukosepolymere synthetisiert werden: Dextran (α -1,6-verknüpfte Hauptkette mit α -1,2- und α -1,3-verknüpften Seitenketten), Mutan (α -1,3-Verknüpfung), Alternan (α -1,6- und α -1,3-Verknüpfung), Reuteran (α -1,4- und α -1,6-Verknüpfung) und Amylose (α -1,4-Verknüpfung).^[97] Neben der Polymersynthese ist auch die Synthese von Akzeptorprodukten möglich, bei der die Glukose auf ein Akzeptormolekül anstelle des wachsenden Glukanpolymers übertragen wird. Die Akzeptorproduktsynthese wird jedoch dadurch limitiert, dass die Produkte meist nur α -1,6-verknüpft sind und lediglich Glukose- unter Verwendung von Saccharose als Substrat- übertragen wird. Häufig dient das entstehende Produkt als Akzeptor für das Enzym, so dass homologe Oligosaccharide entstehen.^[98, 99]

3.3 Umweltaspekte

Die klassischen Kohlenhydratsynthesen erfolgen mit großem Aufwand an Hilfschemikalien (Schutzgruppenchemie) und in organischen Lösungsmitteln. Es gibt einige vielversprechende Synthesemethoden wie die Eintopfsynthese oder automatisierte Festphasensynthese. Die Eintopfsynthesestrategie wird durch das Auffinden geeigneter Bausteine mit fein abgestimmten Reaktivitäten begrenzt. Beispielsweise mussten Seeberger et al. bei der Synthese des Malaria-toxins schwierige Glykosylierungen in Lösung durchführen, welche auf fester Phase nicht durchführbar waren (siehe Abbildung 3-4).^[70] Auch wenn die Anzahl der Stufen reduziert und die Gesamtausbeute gegenüber klassischen Synthesen in Lösung erhöht werden konnte, muss die aufwendige Synthese der einzelnen Bausteine in Betracht bezogen werden. Diese werden in der Regel in mehrstufigen Synthesen hergestellt, bei denen enorme Mengen an Lösungsmitteln, umweltbelastenden Reagenzien und ein nicht zu vernachlässigender Zeitbedarf notwendig sind. Die enzymatische Synthese dagegen verläuft umweltfreundlich im wässrigen Milieu und bei milden Temperaturen. Daraus ergibt sich eine

drastische Umweltentlastung sowie Ressourcenschonung, da mit Zuckern überwiegend nachwachsende Rohstoffe eingesetzt werden. Der Einsatz von Kohlenhydraten und enzymatischen Synthesewegen zur Vermeidung organischer Lösungsmittel und Reduktion chemischer Hilfsstoffe bedeutet einen präventiven Charakter der Umweltentlastung. Beim Einsatz bakterieller Glykosyltransferasen werden sowohl Rohstoffe (Edukte) als auch Energie eingespart, gleichzeitig wird die anfallende Schadstoffmenge (Schwermetalle, Lösungsmittel) eliminiert. Jedoch sind nicht alle Strukturen mithilfe von Enzymen möglich, insbesondere wenn größere Mengen Produkt benötigt werden. Kombinierte chemoenzymatische Ansätze bieten sowohl umweltschonende als auch effektive Synthesewege, deren Weiterentwicklung für komplexe Verknüpfungen zukunftsweisend sein wird.

4 Mikroarrays

Kohlenhydrate weisen äußerst komplexe Strukturen auf. Alle bei Säugetieren vorkommenden Glykane lassen sich aus 9 Monosacchariden aufbauen. Theoretisch ergeben sich daraus etwa 10^{12} mögliche Strukturen, die jedoch nicht alle in der Natur auftauchen. Bisher sind etwa 2000 in Säugetieren vorkommende Glykane bekannt. Die Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen wird durch ihre niedrige Affinität – meist mit K_d s im mikromolaren Bereich – erschwert.^[100-103] Kohlenhydrat-Mikroarrays bieten zahlreiche Vorteile bei der Untersuchung von Kohlenhydraten. Die Kohlenhydrate haben eine definierte Ausrichtung auf der Oberfläche des Arrays, was ihrer Präsentation auf Zelloberflächen entspricht. Da Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen nur im mikromolaren Bereich liegen, sind häufig multivalente Wechselwirkungen für das Zustandekommen von Erkennungsprozessen erforderlich. Diese sind auch bei der Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen erforderlich und lassen sich durch die Präsentation zahlreicher Kohlenhydrate auf dem Array herbeiführen. Für Arrays werden nur minimalste Mengen an Glykan und kohlenhydratbindendem Protein benötigt, desweiteren sind Mikroarrays für Hochdurchsatzscreenings geeignet. Ebenso ist ein empfindlicher Nachweis beispielsweise durch den Nachweis mit sekundären Antikörpern möglich, wodurch die Signale verstärkt werden.

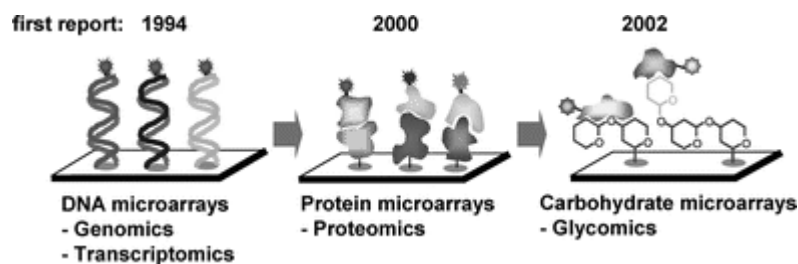


Abbildung 4-1: Die Anwendung von Mikroarrays in der Genomik, Proteomik und Glykomik.^[104]

Die ersten Kohlenhydrat-Mikroarrays im Chipformat existieren seit 2002 (siehe Abbildung 4-1).^[105] Die Glykane, welche auf die Arrays gebunden werden, können entweder von Zellen isoliert, chemisch synthetisiert oder auf dem Array durch Enzyme modifiziert werden (siehe Abbildung 4-2). Zur Anbindung der Kohlenhydrate an die Arrays existieren zahlreiche

Methoden, von denen die meisten bereits bei DNA-Arrays etablierte Methoden sind. Bei den ersten Arrays wurden Glykolipid-Chromatogramme mit Antikörpern untersucht.^[106] Das Konzept konnte wenige Jahre später auf 96-well Mikrotiterplatten übertragen werden.^[107] Die Anbindung der Glykane auf die Oberfläche des Arrays kann sowohl kovalent als auch nicht-kovalent erfolgen. Bei der nichtkovalenten Anbindung wurden mit Nitrocellulose^[108, 109] oder oxidiertem Polystyrol²⁹ beschichtete Slides verwendet. Biotinylierte Kohlenhydrate wurden an Streptavidin-beschichtete Slides gebunden ebenso Kohlenhydrate mit fluorierten Linkern an fluoroalkylsilan-modifizierte Array-Oberflächen^[110]. Die kovalente Anbindung erfolgt in den meisten Fällen über die Anbindung von Thiolen an Maleimid^[111] oder Aminen und *N*-Hydroxysuccinimid-aktivierte Ester.^[112] Ebenso wurden über Klick-Chemie azidfunktionalisierte Glykane an alkin-funktionalisierte Oberflächen^[113] als auch Polysaccharide durch Licht-induzierte Immobilisierung an eine photoaktivierbare Dextranoberfläche gebunden^[114]. Oft sind zahlreiche Schritte notwendig, um die isolierten oder synthetisierten Kohlenhydrate mit reaktiven Linkern zu versehen. Unter Öffnung der Ringstruktur ist eine leichtere Einführung eines primären Amins möglich, was jedoch die Gesamtstruktur des Kohlenhydrats beeinträchtigt.^[115] Die Wahl der Immobilisierungsmethode hängt von zahlreichen Faktoren wie der Funktionalisierbarkeit der Kohlenhydrate, der Effektivität der Kupplungsreaktion und der möglichen Nebenreaktionen bei der Derivatisierung der Kohlenhydrate als auch ihrer Anbindung an die Oberfläche ab. Außerdem wird man je nach Nachweismethode eine Oberfläche mit geringer Hintergrundbindung den Vorzug geben. Der Nachweis der auf dem Array gebunden Kohlenhydrate kann durch Massenspektrometrie^[113, 116], fluoreszenzmarkierte Lektine und Antikörper^[117] oder durch Anfärben von Zellen^[118] erfolgen (siehe Abbildung 4-2).

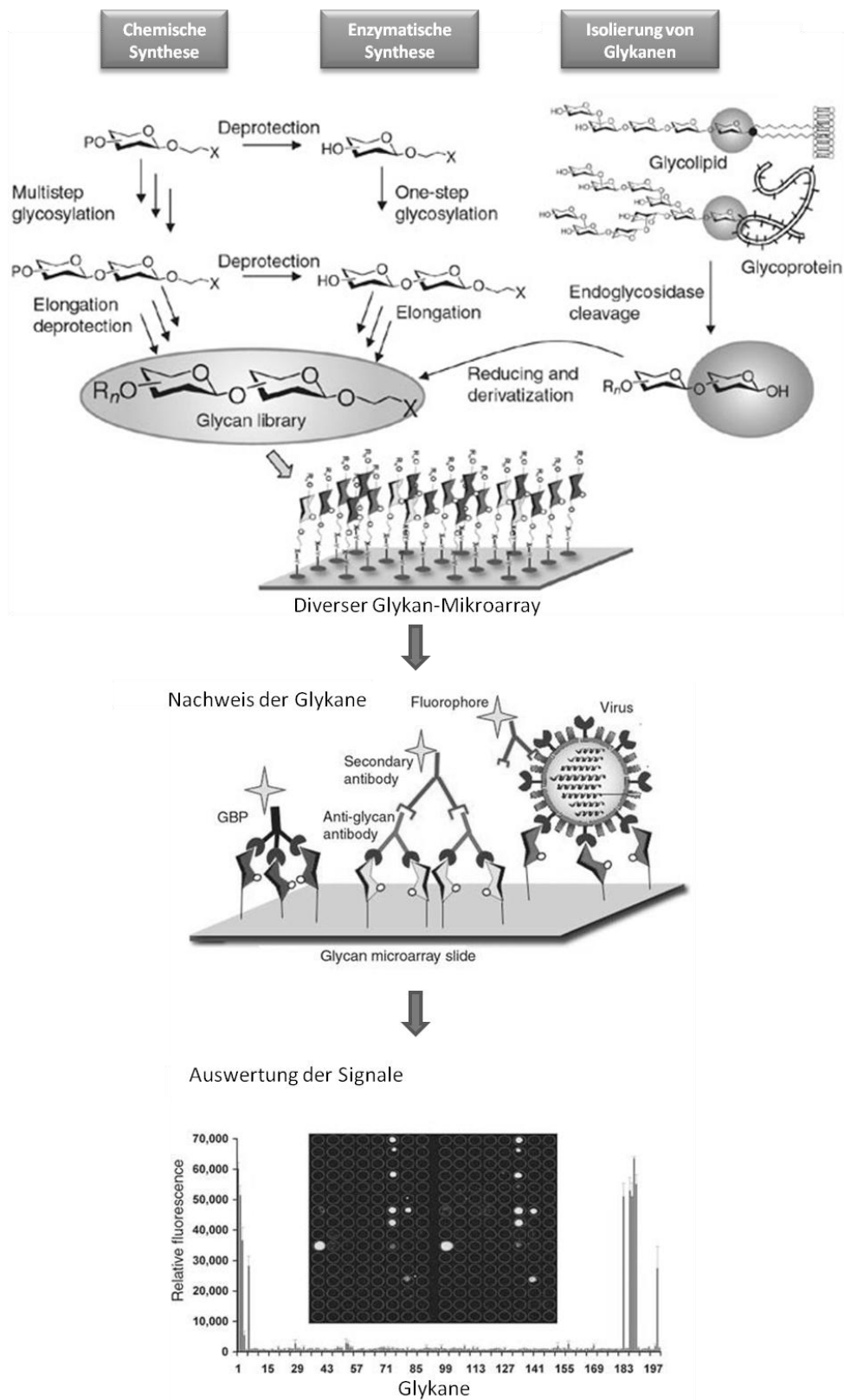


Abbildung 4-2: Erzeugung und Untersuchung von Kohlenhydrat-Mikroarrays.^[119]

Mithilfe von Kohlenhydrat-Mikroarrays wurden die Wechselwirkungen von Kohlenhydraten mit Proteinen, RNA, Viren, Antikörpern und Zellen untersucht. Blixt et al. verwendeten eine Bibliothek von etwa 200 synthetischen und natürlichen Kohlenhydraten, deren Wechselwirkungen mit pflanzlichen und mikrobiellen Lektinen, Antikörpern und intakten Viren untersucht wurde. Hierbei konnten sowohl bekannte Affinitäten bestätigt als auch neue Spezifitäten beobachtet werden.^[117] Bochner et. al verwendeten einen Mikrotiterplatten-Array, um neue Liganden für Siglec-8, ein Sialinsäure bindendes Lektin, welches die Funktion und das Überleben diverser Zellen reguliert, zu finden. Mit bisherigen Methoden war es nicht möglich, Liganden mit hoher Affinität zu Siglec-8 und signifikante Strukturmerkmale solcher Liganden herauszufinden.^[120] Die Anbindung von Grippeviren an Rezeptoren der Wirtszellen erfolgt über das Glykoprotein Hemagglutinin auf der Virusoberfläche. Menschliche Grippeviren binden an α -2,6 verknüpfte Sialinsäure auf den Rezeptoren von Epithelzellen der Lunge und des Atmungstraktes, während Vogelgrippeviren an α -2,3 verknüpfte Sialinsäure an Rezeptoren auf Darm-Epithelzellen binden.^[121-123] Mithilfe eines Glykanarrays konnten die Spezifitäten menschlicher und Vogelgrippeviren bestätigt werden, als auch Unterschiede in der Spezifität von Hemagglutinin bezüglich der Fucosylierung, Sulfatierung und Sialylierung von Kohlenhydraten nachgewiesen werden. Überdies konnte gezeigt werden, dass durch lediglich zwei Mutationen eines Hemagglutinins die Spezifität von auf Humanzellen vorkommender α -2,6 verknüpfter Sialinsäure zu auf Vogelzellen vorkommender α -2,3-verknüpfter Sialinsäure geändert werden konnte.^[124] Mikroorganismen tragen in manchen Fällen Antigene auf ihrer Oberfläche, welche denen auf Wirtszellen ähneln.^[125] So ist es ihnen möglich, sich vor dem Immunsystem des Wirtes zu tarnen. Um die Mechanismen mikrobieller Infektionskrankheiten besser zu verstehen, ist eine Untersuchung mikrobieller Antigene notwendig. Ein sehr umfangreicher Array mikrobieller Polysaccharide wurde von Wang et al. entwickelt. Mit diesem Array konnte ein neuer zellulärer Marker gefunden werden.^[108] Wang et. al. untersuchten Seren, die SARS-CoV neutralisierende Antikörper enthielten, auf einem Kohlenhydratmikroarray. Sie fanden heraus, dass die Kohlenhydratstruktur von SARS-CoV der von menschlichen Glykanen ähnelt.^[126]

Kohlenhydrat-Mikroarrays können des Weiteren dazu verwendet werden, Enzymaktivitäten und -spezifitäten zu bestimmen. Mithilfe eines Arrays konnten vier Fucosyltransferaseinhibitoren mit nanomolare K_i s identifiziert werden. Der Nachweis erfolgte

mithilfe eines fukosespezifischen Lektins.^[127] Neue Substratspezifitäten einer bakteriellen Glykosyltransferase konnten auf einem Array identifiziert werden, wodurch die Glykosylierung von Aminosäuren und Glykoethern mit Saccharose als Substrat ermöglicht wurde.^[112] Die Aktivität von β -1,4-Galaktosyltransferasen wurde auf einem Mikroarray^[128] ebenso die Spezifität einer Polypeptid N-Acetylgalactosaminyltransferase auf einer Goldoberfläche mit massenspektrometrischem Nachweis^[129] untersucht. Verschiedene rekombinante Sialyltransferasen wurden im Hochdurchsatzverfahren auf neue Akzeptorspezifitäten hin untersucht. Hierbei wurde biotinylierte CMP-Sialinsäure als Substrat verwendet und mit einem Fluorescein-Streptavidinkonjugat nachgewiesen. Es konnten sowohl bekannte als auch neue Spezifitäten nachgewiesen werden. Diese Methode ist somit auch für die Erweiterung einer bestehenden Glykan-Bibliothek auf einem Array geeignet.^[130]

Ein für die Entwicklung von Immuntherapien vielversprechendes Experiment wurde von Wong et al. durchgeführt. Hierfür wurden Oligosaccharide durch 1,3-dipolare Cycloaddition auf die Oberfläche eines Virus gebunden. Die Impfung von Hühnern mit diesen modifizierten Viren führte zur Bildung polyklonaler anti-Kohlenhydrat Antikörper, welche die entsprechenden Oligosaccharide auf einem Mikroarray spezifisch erkennen konnten.^[131] Das Auffinden resistenzsicherer Antibiotika ist eine der größten Herausforderungen der Medizin. Resistenzen gegen Aminoglykosid-Antibiotika werden durch bestimmte Enzyme verursacht, welche die Antibiotika modifizieren. Aminoglykoside wurden auf einem Array gebunden und durch Resistenzenzyme modifiziert. Anschließend wurde das therapeutische Target zugegeben und seine Bindung an die modifizierten Antibiotika untersucht.^[132] Glycosylphosphatidylinositol (GPI) ist ein mit Malaria assoziiertes Toxin. Menschen in Malaria-gefährdeten Gebieten besitzen hohe Titer an anti-GPI Antikörpern, wohingegen Kinder unter 2 Jahren nicht in der Lage sind, diese Antikörper zu produzieren. Mithilfe eines GPI-Arrays wurde Serum von Menschen verschiedener Regionen untersucht. Die Arrays sollen der Entwicklung GPI-basierter Malaria-Impfstoffe dienen.^[133]

Ein erheblicher Fortschritt für die Untersuchung der biologischen und krankheitsassoziierten Funktionen von Kohlenhydraten wäre die Präsentation des gesamten Glykoms auf einem einzelnen Chip. Wann und ob dieses Ziel erreicht wird, ist bis jetzt noch nicht abzusehen. Kohlenhydrat-Mikroarrays bieten aber zur Zeit schon ein exzellentes Werkzeug, um Kohlenhydrat/Ligand Interaktionen zu untersuchen und Inhibitionsstudien durchzuführen,

durch welche neue Wirkstoffe identifiziert werden können. Kohlenhydrat-basierte Impfstoffe können auf ihre Wirksamkeit getestet und neue Biomarker entdeckt werden, welche die bisherigen DNA- und Protein-Biomarker in ihrer Spezifität überbieten, wodurch eine bessere und frühere Diagnose von Krankheiten ermöglicht wird.

5 Zielsetzung und Planung der Arbeit

Biologische Prozesse wie Zellerkennung, Virusinfektionen, Tumormetastasen und Gehirnentwicklung werden maßgeblich durch Kohlenhydrate beeinflusst. Das detaillierte Verständnis ihrer Funktionen bei diesen Prozessen soll die Entwicklung von neuen Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten und Krebs als auch das Auffinden von Biomarkern für zahlreiche Krankheiten vorantreiben.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer nachhaltigen chemoenzymatischen Synthese zum Aufbau komplexer Oligosaccharide. Deren Synthese ist erforderlich, um biologische Prozesse genauer zu verstehen, da die Isolierung von Kohlenhydraten in ausreichenden Mengen und homogenen Formen nur begrenzt möglich ist. Chemische Syntheserouten bedürfen größtenteils Schwermetallreagenzien wie AgOTf, HgBr₂ und HgCN₂ und verlaufen nur selten selektiv, so dass eine Auftrennung von Produktgemischen erforderlich ist. Zudem erfordern sie häufig lange Reaktionszeiten und aufgrund zahlreicher benötigter Stufen werden nur geringen Ausbeuten erhalten. Enzyme, welche zur Synthese von Kohlenhydraten eingesetzt werden, können komplexe Strukturen zwar selektiv synthetisieren, sind aber zu teuer und instabil für die Synthese größerer Mengen. Eine Alternative bieten bakterielle Glukansucrasen, welche Saccharose als kostengünstiges Substrat verwenden. Deren Diversität ist jedoch begrenzt auf bestimmte Verknüpfungen. Durch Substrat-Engineering sollte die Diversität der Glukansucrasen erweitert und eine Möglichkeit zu weiteren Modifikationen der enzymatisch synthetisierten Oligosaccharide geschaffen werden. Dadurch sollten Thiooligosaccharide aufgebaut werden, welche den Vorteil bieten, dass sie wegen ihrer Hydrolysestabilität von erhöhtem Nutzen beim Einsatz als Kohlenhydrat-basierte Wirkstoffe oder als Proben zur Untersuchung von Enzymmechanismen sein können.^[134] Die Synthesen sollten möglichst schutzgruppenfrei und ohne Einsatz halogener Lösungsmittel verlaufen. Außerdem sollten sie selektiv sein, so dass aufwendige Aufarbeitungsschritte wegfallen.

Als zweite Aufgabe sollte ein Mikroarray entwickelt werden, auf dem die Wechselwirkungen der synthetisierten Oligosaccharide mit relevanten Biomolekülen untersucht werden können. Hierbei sollten zunächst pflanzliche Lektine eingesetzt werden, um die Verwendungsmöglichkeit des Mikroarrays zu demonstrieren. Mikroarrays bieten den Vorteil, die Kohlenhydrate unter Bedingungen zu untersuchen, welche denen zellulärer Prozesse

ähnlich sind. Außerdem sollten die auf dem Array gebundenen Kohlenhydrate durch Enzyme weiter modifiziert werden, um eine größere Diversität zu erzielen. In bisherigen Arbeiten konnten Oligosaccharide erfolgreich auf eine 96-well Mikrotiterplatte gebunden und durch Glykosyltransferasen modifiziert werden. Der Nachweis erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten Lektin.^[112]

Um dieses Konzept zur Entwicklung von Kohlenhydrat-basierten Wirkstoffen und Leitstrukturen nutzen zu können, sollte ein biologisch-relevantes Molekül, das tumorassoziierte Antigen Sialyl-Tn, als auch sein thioglykosidisch verknüpftes Analogon synthetisiert und auf dem Mikroarray nach Wechselwirkungen mit Proteinen untersucht werden. Dadurch sollte herausgefunden werden, inwieweit die durch eine effektive Synthese leicht zugänglichen Thiooligosaccharide als potentielle Tumorimpfstoffe in Frage kommen.

6 **Synthese von Thiooligosacchariden**

Enzymatische Transformationen mit Leloir-Glykosyltransferasen, welche nukleotidaktivierte Zucker als Substrate benötigen, bieten die Möglichkeit zu stereoselektiven und konformationsspezifischen Glykosylierungen^[135]. Jedoch ist die Verwendung dieser Art von Glykosyltransferasen mit hohen Kosten für nur kleine Mengen an Produkten verbunden. Bakterielle Nicht-Leloir-Glykosyltransferasen ermöglichen einen alternativen Weg zur Synthese von Glykosiden. Diese Glykosyltransferasen katalysieren die Bildung großer Glukosepolymere aus Saccharose.^[136, 137] Eine Reihe von Akzeptorreaktionen mit kleinen Akzeptormolekülen ist bekannt, welche Zugang zu mehr oder weniger komplexen Glykostrukturen liefern.^[138] Die Anpassungsfähigkeit dieser Reaktionen zeigt sich in der Tatsache, dass verschiedene Enzyme unterschiedliche Verknüpfungen in den von ihnen hergestellten Polysacchariden bilden, wie α -1,6-verknüftes Dextran, α -1,3-verknüftes Mutan, α -1,4-verknüftes Reuteran oder Amylose und α -1,3- α -1,6-alternierendes Alternan.^[136, 137] Seit geraumer Zeit ist es bekannt, dass neben Polysacchariden auch Oligosaccharide gebildet werden können.^[139] In der Gegenwart geeigneter Akzeptoren, verschiebt sich die Glukansynthese zugunsten der Oligosaccharidsynthese.^[98] Ein breites Spektrum an Akzeptorreaktionen mit kleinen Akzeptormolekülen wurde charakterisiert.^[99, 140] Daraus resultierten mehr oder weniger komplexe Glykostrukturen.^[95, 136-138, 141] Dennoch sind die Akzeptorprodukte, welche von diesen Enzymen mit kleinen Zuckern gebildet werden, größtenteils α -1,6-verknüpft. In einigen Fällen wurde eine Änderung der Verknüpfungsspezifität beobachtet.^[142] Um diese Enzyme für den gezielten Aufbau von Oligosacchariden zu verwenden, muss ein Weg gefunden werden, diese Reaktionen zu kontrollieren. Es wurden verschiedene Ansätze verwendet, um die Regioselektivität enzymatischer Glykosylierungen zu ändern. Es wurden sowohl Enzym als auch die Struktur des Akzeptors verändert, wobei hauptsächlich Glykosidasen eingesetzt wurden.^[143, 144] MacManus und Vulfson zeigten, dass die Regioselektivität durch Blockieren von Hydroxylgruppen geändert werden kann.^[145] Vor kurzem zeigten Lairson et al. einen ähnlichen Ansatz unter Verwendung einer Leloir-Glykosyltransferase.^[146]

6.1 Enzymatische Glykosylierung

Zur enzymatischen Glykosylierung wurden Glukansucrasen verwendet, welche zu extrazellulären Enzymen gehören, die hauptsächlich durch Milchsäurebakterien wie *Streptococcus*, *Lactobacillus* und *Leuconostoc spp.* produziert werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Glykosyltransferase R (GTFR) aus *Streptococcus oralis* aus Saccharose die Synthese eines α -1,6-gebundenen Glukans mit einer α -1,3-verzweigten Seitenkette synthetisiert.^[112] Vorherige Untersuchungen demonstrierten die Fähigkeit der GTFR, unnatürliche Akzeptoren wie Alkohole verschiedener Kettenlänge und Aminosäuren zu glykosylieren, welche die Vielzahl der mit diesem Enzym möglichen Akzeptorreaktionen aufzeigt^[112]. Hier wurde beobachtet, dass der Akzeptor Maltose **34** mit einer α -1,6-Verknüpfung glykosyliert wurde, so dass *O*- α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucose (Panose) **35** entstand. Das normale Muster ändert sich, wenn Laktose **36** als Akzeptor verwendet wird, wodurch α -1,2 verknüpft **37** entsteht (siehe Abbildung 6-1). Die Änderung des 1,6-Glykosylierungsmusters kommt bei der Verwendung von Laktose als Akzeptor offensichtlich durch die axiale Stellung der 4'-Hydroxylgruppe zustande, wodurch die 6'-Hydroxylgruppe für das Enzym nicht ausreichend zugänglich ist und die Glykosylierung stattdessen an Position 2 erfolgt. Dies zeigt die prinzipielle Möglichkeit, die Chemo Selektivität eines Enzyms durch die geeignete Wahl des Akzeptors zu dirigieren.

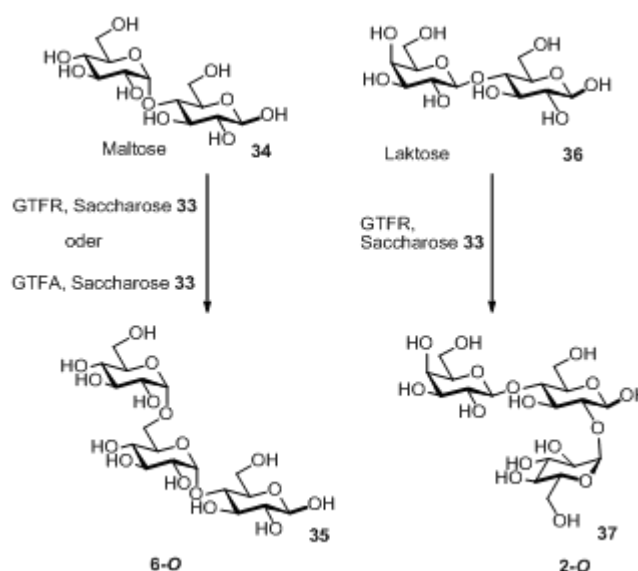


Abbildung 6-1: Chemo selektive Glykosylierung.

Wird D-Glukose **38** als Akzeptor der GTFR verwendet, bildet sich Isomaltose **39**, ein Disaccharid mit einer α -1,6-Verknüpfung. Es sollte getestet werden, ob sich die Selektivität der Glukansucrase GTFR ändern lässt, wenn die 6-Hydroxylgruppe der Glukose blockiert wird. Zur Blockierung wurde die Tosylierung von Position 6-OH der Glukose gewählt. Die Reaktion von GTFR mit Saccharose und dem neuen Akzeptor 6-*O*-*para*-Toluolsulfonyl-D-glucopyranose **42** führte zur Bildung des Akzeptorprodukts **43** in einer guten Ausbeute (48%).

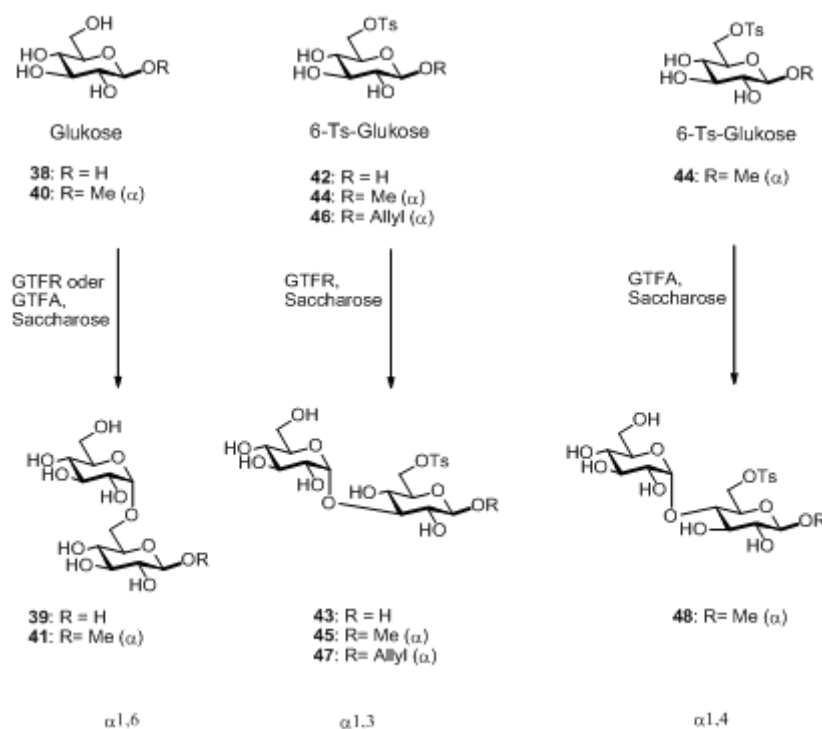


Abbildung 6-2: Glykosylierung modifizierter Akzeptoren.

Isolierung und Charakterisierung dieses Produktes **43** mittels NMR-Korrelationsspektroskopie zeigten, dass die Transglykosylierung an Position 3 stattfand, wobei eine α -1,3-Bindung gebildet wurde, was mit der Verzweigungsaktivität dieses Enzyms übereinstimmte. Die Blockierung der bevorzugten Transglykosylierungsseite verschob die Glykosylierung von der Haupt-1,6- zur Seitenketten-1,3-Aktivität. Bei Reaktionen mit verschiedenen Akzeptor/Substrat-Konzentrationen lagen die Ausbeuten der glykosylierten Produkte im Bereich von 50%. Daher wurden die Akzeptoren zur Steigerung der Ausbeute am reduzierenden Ende variiert und tosylierte Methylglucopyranose **44** und Allylglucopyranose **46** verwendet. **46** wurde durch Umsetzung von Allylglukose mit *para*-Toluolsulfonylchlorid in Pyridin bei RT über 24 h in einer Ausbeute von 46% erhalten. Durch den Einsatz der am

reduzierenden Ende modifizierten Akzeptoren **44** und **46** stiegen die Ausbeuten der entsprechenden Produkte **45** (95%) und **47** (62%) drastisch bis hin zu vollständigem Umsatz an (siehe Abbildung 6-2). Durch den Einsatz der an Position 6 substituierten Akzeptoren war es nun möglich, die Übertragung der Glukose mithilfe der GTFR von Position 6 zu Position 3 zu dirigieren. Zur Erhöhung der strukturellen Diversität wurde ein weiteres anderes Enzym, nämlich Glykosyltransferase A (GTFA) aus *Lactobacillus reuteri*, verwendet. Dieses Enzym ist eine Reuteransucrase, welche das α -1,4-verknüpfte Glukan Reuteran bildet^[147]. Dagegen sind die durch das Enzym gebildeten Akzeptorprodukte von D-Glukose **38** und Maltose **34** hauptsächlich Isomaltose **39** und Panose **35**, welche α -1,6-verknüpfte sind. Wird Isomaltose selbst als Akzeptor verwendet, zeigt das entstehende Produkt eine α -1,4-Verknüpfung, gefolgt von weiteren Akzeptorprodukten mit α -1,6-Verknüpfung^[148]. Diese Diversität verdeutlicht die Variabilität der Verknüpfungsbildung durch dieses Enzym, was die Möglichkeit aufzeigt, die Glykosylierung durch dieses Enzym von Position 6 zu Position 4 zu dirigieren. Wie erwartet bildete die GTFA aus dem tosylierten Methylglucopyranose- **44** und Allylglucopyranoseakzeptor **46** die Disaccharide **48** (17%) und **49** (17%) mit jeweils α -1,4-Verknüpfung, jedoch wurde ebenfalls Hydrolyse als dominierende Reaktion beobachtet. Die Produkte, welche durch die enzymatischen Reaktionen erhalten wurden, zeigen die Möglichkeit, die Glykosylierung von einer Hauptverknüpfung zu einer Seitenaktivität zu lenken.

Tabelle 6-1: Akzeptorprodukte der GTFR und GTFA.

Akzeptor	Produkte (Ausbeuten in %)	
	GTFR	GTFA
Glc 38	Glc α (1,6)Glc 39	Glc α (1,6)Glc 39
TsGlc 42	Glc α (1,3)-TsGlc 43 (47)	
TsGlcOMe 44	Glc α (1,3)- 6-TsGlcOMe 45 (95)	Glc α (1,4)-6-TsGlcOMe 48 (17)
TsGlcOAll 46	Glc α (1,3)- 6-TsGlcOAll 47 (62)	Glc α (1,4)-6-TsGlcOAllyl 49 (17)

6.1.1 Diskussion der spektroskopischen Daten der Akzeptorprodukte der GTFR und GTFA

Der Strukturbeweis von Verbindung **37** gelang mithilfe der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Im ^1H -NMR-Spektrum resoniert H-1'' bei $\delta = 5.33$ als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 4.0$ Hz, was auf eine α -glykosidische Bindung schließen lässt. Es konnten sowohl das β -Anomer mit einer chemischen Verschiebung für H-1 von $\delta = 4.79$ und einer charakteristischen Kopplungskonstante des Dubletts von $J = 7.9$ Hz als auch das α -Anomer mit einer chemischen Verschiebung für H-1 von $\delta = 5.41$ und einer charakteristischen Kopplungskonstante des Dubletts von $J = 3.6$ Hz isoliert werden. H-1' des β -Anomers resoniert als Dublett bei $\delta = 4.43$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 7.8$ Hz und dem Signal des entsprechenden Kohlenstoffatoms C-1' im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 105.11$. Beim α -Anomer resoniert H-1' im ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 4.44$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 7.8$ Hz. Das entsprechende Signal des Kohlenstoffatoms C-1' lässt sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 105.21$ erkennen. Die chemische Verschiebung von C-2 liegt bei $\delta = 80.51$ für das β -Anomer und bei $\delta = 77.78$ für das α -Anomer. Im Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrum (ESI-MS) lässt sich ein Basispeak bei $m/z = 527$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$ erkennen. Die Verknüpfungen der tosylierten Akzeptorprodukte **43**, **45**, **47** und **48** konnten mittels NMR-Korrelationsspektroskopie nachgewiesen werden. Die Protonen H-1' der Verbindungen **43**, **45**, **47** und **48** resonieren bei $\delta = 5.37$, 4.96 , 4.96 und 5.25 als Dubletts mit Kopplungskonstanten von $J = 4.0$, 3.9 , 3.7 und 3.8 Hz, was die α -glykosidische Verknüpfung bestätigt. Bei den Akzeptorprodukten der GTFR **43**, **45** und **47** resoniert im HMBC-Korrelationspektrum H-1' mit C-3 , was auf eine α -1,3-glykosidische Bindung schließen lässt (siehe Abbildung 6-3). Beim Akzeptorprodukt der GTFA **48** resoniert im HMBC-Korrelationspektrum H-1' mit C-3 , was auf eine α -1,4-glykosidische Bindung schließen lässt. Für das β -Anomer von **43** resoniert H-1 im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 4.65$ mit einer charakteristischen Kopplungskonstante von $J = 8.1$ Hz. H-1 des α -Anomers resoniert als Dublett bei $\delta = 5.19$ mit einer charakteristischen Kopplungskonstanten von $J = 3.8$ Hz. Die Signale der Tosylgruppe der beiden Anomere resonieren als Dubletts bei $\delta = 7.90$ und $\delta = 7.55$ mit einer Kopplungskonstante von jeweils $J = 8.0$ Hz. Die Signale der Methylgruppe der Tosylgruppe resonieren bei beiden Anomeren als Singuletts bei $\delta = 2.52$ und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 23.06$. Für C-1 des β -Anomers

lässt sich im ^{13}C -NMR-Spektrum ein Signal bei $\delta = 98.24$ finden. C-1 des α -Anomers ist bei $\delta = 94.48$ zu erkennen.

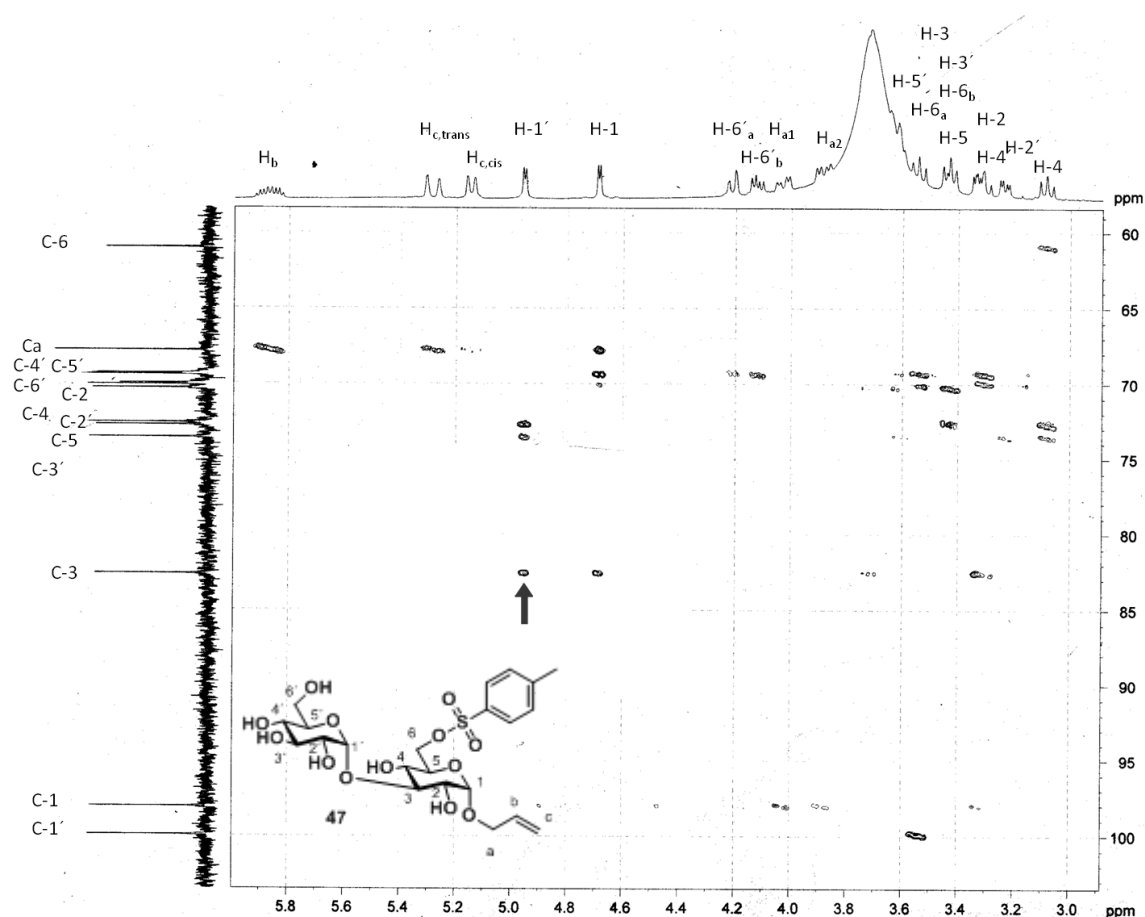


Abbildung 6-3: HMBC-Spektrum des GTFR-Akzeptorprodukts **47** (400 MHz, D_2O).

Bei Verbindung **45** resoniert H-1 im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 4.57$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.6$ Hz, was charakteristisch für das α -Anomer ist. H-3 resoniert als Triplet bei $\delta = 3.51$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 9.3$ Hz. Die Protonen der Tosylgruppe resonieren als Dubletts bei $\delta = 7.79$ und $\delta = 7.50$ mit Kopplungskonstanten von jeweils $J = 8.0$ Hz. Die Methylgruppe der Tosylgruppe resoniert als Singulett bei $\delta = 2.43$. Die Methoxygruppe resoniert als Singulett bei $\delta = 3.24$ und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 54.65$. Die Signale der Kohlenstoffatome C-1 und C-3 sind im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 99.69$

und $\delta = 82.49$ zu erkennen. Die Kohlenstoffatome der Tosylgruppe resonieren zwischen $\delta = 145.02$ und $\delta = 127.65$. Das Signal der Methylgruppe der Tosylgruppe ist bei $\delta = 21.13$ zu finden.

Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **46** resoniert H-1 als Dublett bei $\delta = 4.74$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.7$ Hz, was charakteristisch für die α -Allylgruppe ist. Die Protonen der Tosylgruppe resonieren bei $\delta = 7.80$ und $\delta = 7.43$ jeweils als Dubletts mit einer Kopplungskonstante von jeweils $J = 8.2$ Hz. Die Protonen der Methylgruppe resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 2.45$. Das Proton H_b der Allylgruppe resoniert bei $\delta = 5.93$ als Dublett eines Dubletts eines Dubletts eines Dubletts mit Kopplungskonstanten von $J = 17.2$ Hz (Kopplung mit $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 10.4 Hz (Kopplung mit $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 6.1 Hz (Kopplung mit H_{a2}) und 5.3 Hz (Kopplung mit H_{a1}). Das Proton $\text{H}_{c,\text{trans}}$ der Allylgruppe resoniert als Quartett eines Dubletts mit Kopplungskonstanten von $J = 17.2$ Hz (Kopplung mit H_b) und 1.7 Hz (Kopplung mit H_{a1}) und das Proton $\text{H}_{c,\text{cis}}$ resoniert als Dublett eines Dubletts eines Dubletts bei $\delta = 5.17$ mit Kopplungskonstanten von $J = 10.4$ Hz (Kopplung mit H_b), 3.1 Hz (Kopplung mit $\text{H}_{c,\text{trans}}$) und 1.3 Hz (Kopplung mit H_{a2}). Das Proton H_{a1} resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 4.12$ mit Kopplungskonstanten von $J = 12.9$ Hz (Kopplung mit H_{a2}) und 5.3 Hz (Kopplung mit H_b). Das Proton H_{a2} resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.96$ mit Kopplungskonstanten von $J = 12.9$ Hz (Kopplung mit H_{a1}) und 6.1 Hz (Kopplung mit H_b). Das Signal des Kohlenstoffatoms C-1 lässt sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 99.04$ finden. Die Signale der Tosylgruppe sind bei $\delta = 146.38$, 130.88 und 129.06 zu erkennen. Das Signal des Kohlenstoffatoms der Methylgruppe lässt sich bei $\delta = 21.60$ erkennen. Die Kohlenstoffatome C_b und C_c haben eine chemische Verschiebung von $\delta = 135.26$ und $\delta = 117.78$.

Bei Verbindung **47** resoniert H-1 im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 4.69$ mit einer für die α -verknüpfte Allylgruppe charakteristischen Kopplungskonstante von $J = 3.5$ Hz. H-3 resoniert als Triplett bei $\delta = 3.55$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 9.2$ Hz. Die Protonen der Tosylgruppe resonieren als Dubletts bei $\delta = 7.77$ und $\delta = 7.48$ mit Kopplungskonstanten von jeweils $J = 8.1$ Hz. Die Methylgruppe der Tosylgruppe resoniert als Singulett bei $\delta = 2.41$. H_b der Allylgruppe resoniert als Dublett eines Dubletts eines Dubletts bei $\delta = 5.92$ - 5.82 mit Kopplungskonstanten von $J = 17.3$, 10.5 und 5.4 Hz. Das Proton $\text{H}_{c,\text{trans}}$ der Allylgruppe resoniert als Dublett bei $\delta = 5.31$ - 5.27 mit einer Kopplungskonstante von $J = 17.3$ Hz und das

Proton $H_{c,cis}$ als Dublett bei $\delta = 5.15$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 10.5$ Hz. Das Proton H_{a1} resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.91$ - 3.86 mit Kopplungskonstanten von $J = 13.3$ und 5.4 Hz. H_{a2} resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 4.05$ - 4.01 mit Kopplungskonstanten von $J = 13.3$ und 6.1 Hz (siehe Abbildung 6-3). Die Kohlenstoffatome C-1 und C-3 resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 98.09$ bzw. 82.65 . Die Kohlenstoffatome der Tosylgruppe lassen sich zwischen $\delta = 145.34$ und $\delta = 127.85$ erkennen. Die Methylgruppe der Tosylgruppe resoniert bei $\delta = 21.35$. C_a lässt sich bei $\delta = 67.86$, C_b bei $\delta = 134.58$ und C_c bei $\delta = 117.21$ finden.

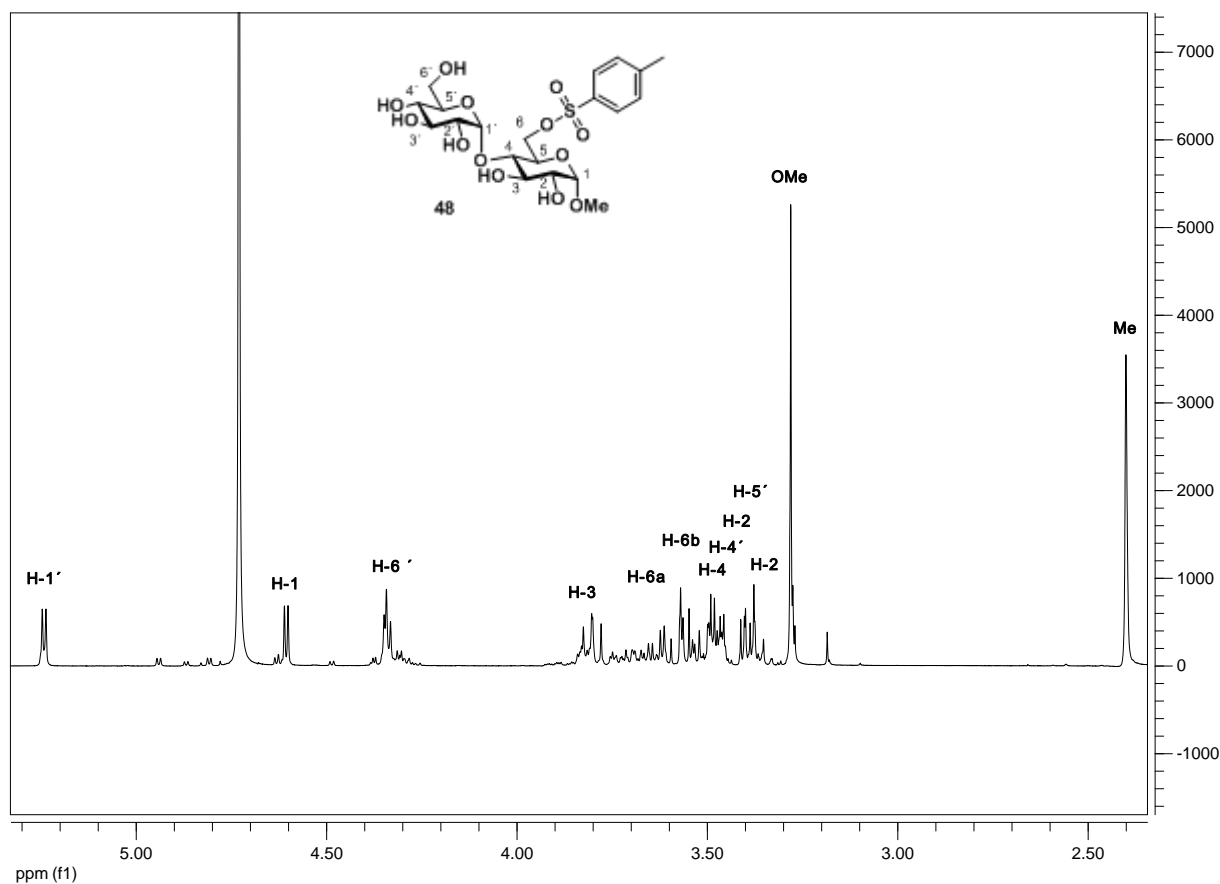


Abbildung 6-4: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **48** (400 MHz, D_2O).

Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **48** resoniert H-1 als Dublett bei $\delta = 4.61$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.8$ Hz und H-4 als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.52$ - 3.47 mit Kopplungskonstanten von $J = 10.0$ und 8.8 Hz. Die Protonen der Tosylgruppe resonieren als Dubletts bei $\delta = 7.80$ - 7.77 und $\delta = 7.45$ mit Kopplungskonstanten von jeweils $J = 8.0$ Hz. Die Methylgruppe der Tosylgruppe resoniert als Singulett bei $\delta = 2.40$. Ein charakteristisches Singulett bei $\delta = 3.28$ lässt sich für die Protonen der Methoxygruppe erkennen (siehe

Abbildung 6-4). Die Signale der Kohlenstoffatome C-1 und C-4 sind im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 101.86$ bzw. 79.64 zu finden. Die Signale der Kohlenstoffatome der Tosylgruppe lassen sich zwischen $\delta = 149.61$ und $\delta = 130.68$ erkennen. Die Methylgruppe der Tosylgruppe zeigt ein Signal bei $\delta = 23.68$. Das charakteristische Signal der Methoxygruppe lässt sich bei $\delta = 58.05$ finden.

Die ESI-Massenspektren der Verbindungen **43**, **45**, **47** und **48** zeigen einen Basispeak bei $m/z = 520$, 534 , 560 bzw. 534 für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.2 Chemische Glykosylierung

Sowohl die Tosylgruppe in Position 6 als auch die Allylgruppe in Position 1 bieten die Möglichkeiten für weitere chemische Modifizierungen, was den Zugang zu verzweigten Oligosacchariden als auch zu Glykopeptiden eröffnet, welche in zahlreichen biologischen Untersuchungen z.B. als Tumorstoffe genutzt werden können. Driguez berichtete über einen konvergenten Ansatz zur Synthese von β -1,6-thio-verknüpften, sowohl linearen als auch verzweigten Oligosacchariden durch anomere S-Alkylierung mittels $\text{S}_{\text{N}}2$ Substitution von 6-Halogeniden durch S-Acetyl geschützte Thiozucker.^[149]

6.2.1 Acetylierte Thiozucker

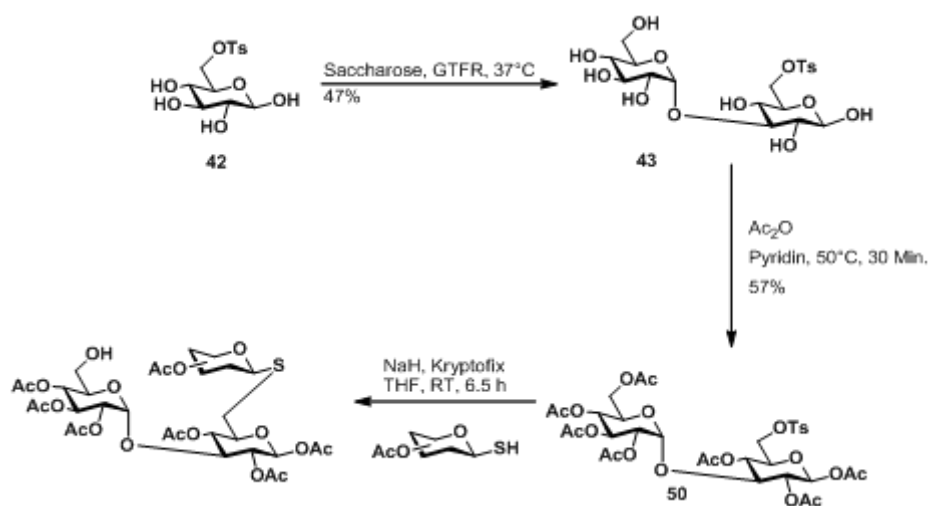
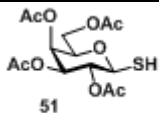
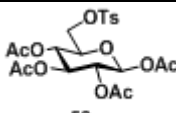
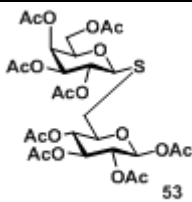
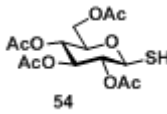
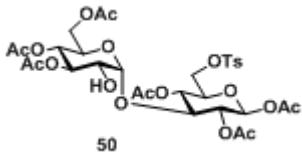
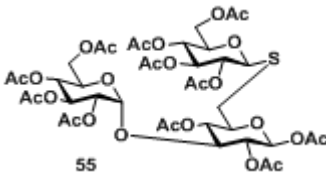
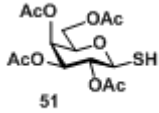
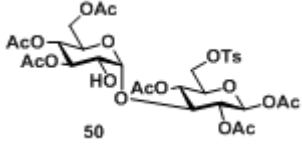
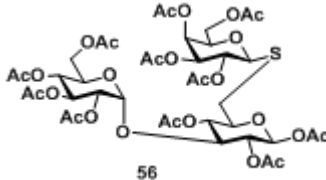


Abbildung 6-5: Acetylierung der Akzeptorprodukte und anschließende Erweiterung zu Thiooligosacchariden durch $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion.

Zur strukturellen Erweiterung der enzymatisch erhaltenen Akzeptorprodukte sollten kommerziell erhältliche 1-Thiozucker verwendet werden, um die Anzahl der benötigten Syntheseschritte so gering wie möglich zu halten. In ersten Versuchen wurde Tosylglukose **43** acetyliert und unter basischen Bedingungen mit peracetylierter Thioglukose **51** in Gegenwart des Kryptanden Kryptofix und Natriumhydrid in THF substituiert, was zum peracetylierten Disaccharid **53** in einer Ausbeute von 75% führte. Der Kryptand Kryptofix sorgt für die Komplexierung des Natriumions unter Bildung eines Kryptats während das Thiolat außerhalb des Kryptats bleibt und so für einen nukleophilen Angriff verfügbarer ist. Mit der gleichen Methode wurden das enzymatisch erhaltene Disaccharid zu **50** acetyliert und anschließend mit peracetylierter Thioglukose **54** bzw. -galaktose **51** substituiert, was zu den peracetylierten Trisacchariden **55** bzw. **56** in einer Ausbeute von 31% bzw. 34% führte (siehe Tabelle 6-2).

Tabelle 6-2: Synthese verzweigter Thiooligosaccharide unter Verwendung von Schutzgruppen.

Donor	Akzeptor	Produkt	Ausbeute [%]
 51	 52	 53	75
 54	 50	 55	31
 51	 50	 56	34

6.2.2 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 53, 55 und 56

In den ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **53**, **55** und **56** resonieren die anomeren Protonen H-1 bei $\delta = 5.64$, 5.55 bzw. 5.54 als Dubletts mit einer Kopplungskonstante von $J = 8.3$, 8.1 bzw. 8.1 Hz, was die β -Stellung der anomeren Acetylgruppe bestätigt (siehe Abbildung 6-6). Die Protonen der Acetylgruppen von **53**, **55** und **56** resonieren als Singuletts bei $\delta = 2.09$ -1.91. Das Signal für C-6 von Verbindung **53** lässt sich im ^{13}C -NMR-Spektrum deutlich hochfeldverschoben bei $\delta = 30.37$ erkennen, was auf die Bildung einer thioglykosidischen Bindung hinweist. Die Acetylkohlenstoffatome von Verbindung **53** resonieren bei $\delta = 170.41$ -168.90 für die Carbonylkohlenstoffatome und $\delta = 22.68$ -20.53 für die Methylgruppen. Die mit der ESI-Technik aufgenommenen Massenspektren zeigen für die Verbindungen **55** und **56** einen Basispeak bei $m/z = 1005$, was dem jeweiligen Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$ zuzuordnen ist.

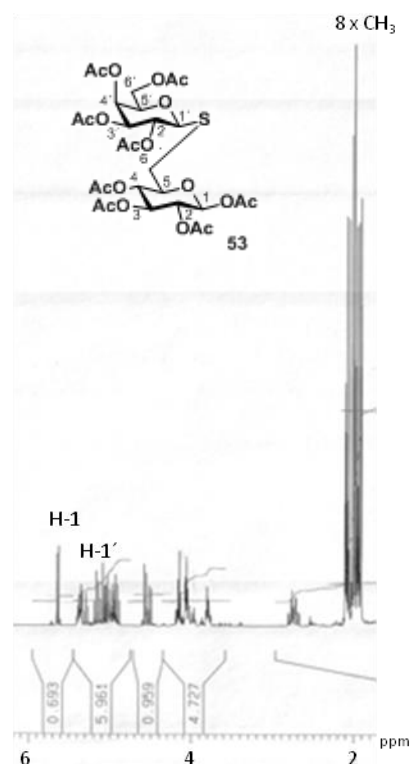


Abbildung 6-6: ^1H -NMR von Verbindung **53** (400 MHz, CDCl_3).

6.2.3 Schutzgruppenfreie Thiozucker

Da die Einführung der Acetyl-Schutzgruppen zusätzliche synthetische Schritte erfordert, sollte die Synthese dahingehend optimiert werden, dass sie komplett ohne Schutzgruppen verläuft. Einerseits sollten hierbei zusätzliche Syntheseschritte vermieden als auch die Umweltverträglichkeit der Synthese optimiert werden. Die im Vergleich zu den Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate hohe Nukleophilie des Thiols sollte es ermöglichen, die Substitution auf direktem Wege ohne Einsatz von Schutzgruppen durchzuführen. Untersuchungen zeigten, dass beim Einsatz gängiger Monosaccharide, die also kein Thiol in Position 1 trugen, keine Substitution der Tosylgruppe erfolgte. Die Nukleophilie des Sauerstoffs schien also zu gering für einen Angriff auf das Tosylat zu sein. Um 1-Thiozucker

direkt mit den aus der enzymatischen Synthese erhaltenen und somit schutzgruppenfreien Tosylaten umzusetzen, wurden weitere Reaktionsbedingungen für diese Reaktion untersucht.

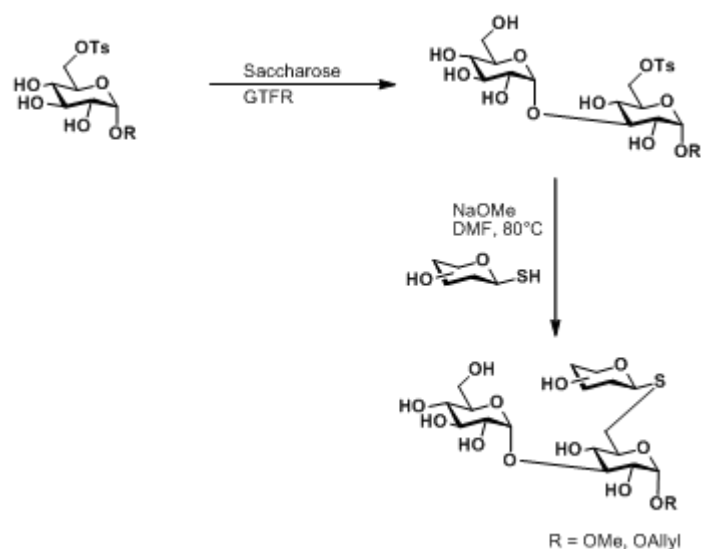


Abbildung 6-7: Zweistufige schutzgruppenfreie chemoenzymatische Synthese von Thiooligosacchariden.

Dabei stellte sich heraus, dass ungeschützte in Position 6 tosylierte Mono- und Disaccharide direkt durch Thiozucker in DMF bei 80 °C substituiert werden können. Die peracetylierten Thiozucker **51** und **54** wurden dazu vorher mit Natriummethanolatlösung sowohl deacetyliert als auch am Thiol deprotoniert und anschließend das Tosylat zugegeben.

6.2.4 Methyl-Thiooligosaccharide

Die Reaktion des 1-Thiozuckers **66**, welcher durch Behandlung von **51** mit Natriummethanolatlösung erhalten wurde, mit **44** in DMF bei 80 °C lieferte das Disaccharid **67** in einer Ausbeute von 90%. Analog dazu wurden **68** und **66**, welche durch Behandlung von **54** und **51** mit Natriummethanolatlösung erhalten wurden, mit **45** zu den entsprechenden Oligosacchariden **69** und **70** in ausgezeichneten Ausbeuten (87% und 91%) umgesetzt. Ein ähnliches Oligosaccharid, welches jedoch α -1,6 O-glykosidisch verknüpft ist, wurde von Koro et al. in mehr als 15 Stufen mit einer Gesamtausbeute von weniger als 2% synthetisiert.^[150]

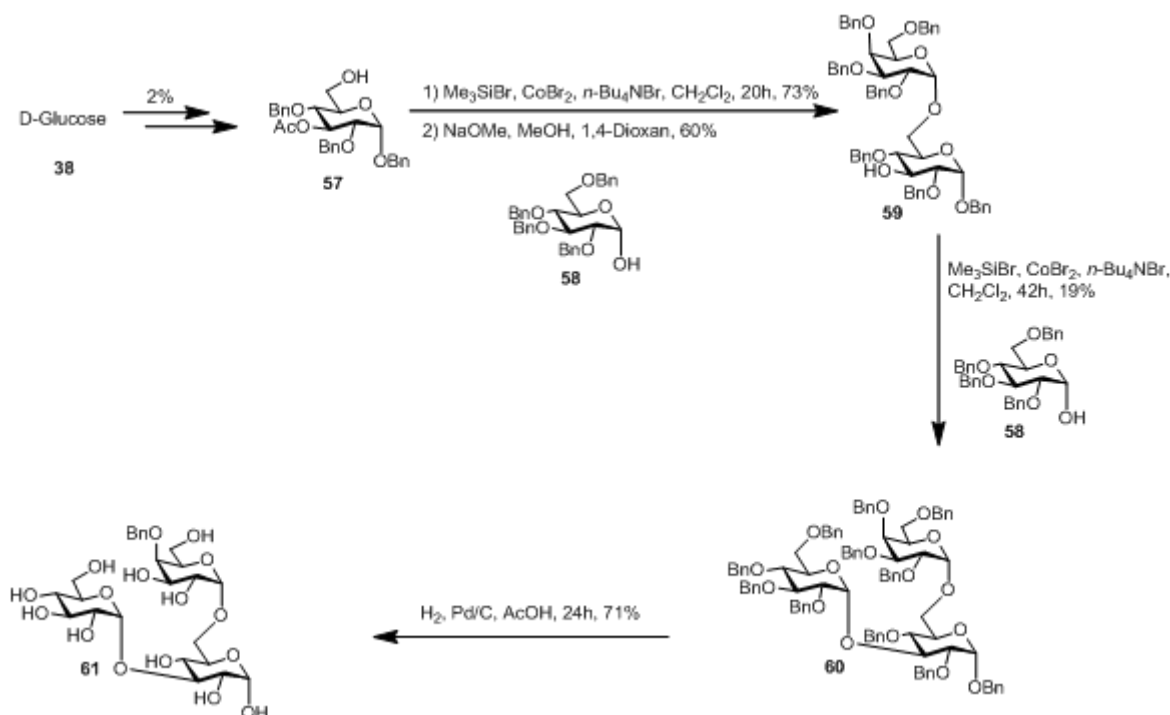


Abbildung 6-8: Klassische Synthese eines Trisaccharids mit mehr als 15 Stufen und einer Ausbeute von weniger als 2%.^[150]

Sialinsäuren sind Bestandteile von Oligosacchariden und befinden sich normalerweise am äußeren Ende von N-Glykanen, O-Glykanen und Glykosphingolipiden. Daher sind sie maßgeblich an zellulären Erkennungsprozessen beteiligt und beeinflussen Wachstum, Differenzierung und die Apoptose von Zellen. Außerdem stabilisieren sie Moleküle, Membranen und die Konformation von Proteinen, ermöglichen aufgrund ihrer negativen Ladung die Bindung und den Transport von Wirkstoffen und schützen Moleküle und Zellen vor Angriffen von Proteasen und Glykosidasen. Darüberhinaus können sie die biologische Erkennung von Zelloberflächenantigenen durch deren Maskierung verhindern, wodurch sich beispielsweise Tumorzellen vor dem Immunsystem tarnen.^[3, 5] α -2,6-verknüpfte Sialinsäuren sind Bestandteil von N-Glykanen, O-Glykanen und Glykolipiden. Sie dienen als Rezeptoren für menschliche Influenzaviren, werden jedoch nicht von anderen Influenzaviren wie beispielsweise Vogelgrippeviren erkannt, welche α -2,3-verknüpfte Sialinsäure binden und beim Menschen nicht vorkommen.^[3] Oligosaccharide, welche α -2,6-verknüpfte Sialinsäure enthalten, sind insofern bedeutsam bei der Erforschung viraler Infektionen.

Sialinsäure enthaltene Oligosaccharide sollten mit der bisherigen Strategie synthetisiert werden. So konnte 2-Thioneuraminsäure **71** bei der Substitutionsreaktion zum Aufbau von Thiooligosacchariden eingesetzt werden. Das entsprechende Vorläufermolekül Neuraminsäurethioacetat wurde durch Veresterung von N-Acetylneuraminsäure mit Methanol unter Zugabe von saurem Ionentauscher, anschließender Chlorierung der Hydroxylgruppe an C-2 mit Acetylchlorid unter gleichzeitiger Acetylierung der übrigen Hydroxylgruppen und darauf folgender Substitution des Chlorids zum Thioacetat mit Kaliumthioacetat in einer Gesamtausbeute von 37% erhalten (siehe Abbildung 6-9). Nach Deacetylierung der S- und O-Acetylgruppen mit Natriummethanolatlösung und gleichzeitiger Deprotonierung des Thiols wurde das Thiolat mit dem Tosylat **45** umgesetzt, was zum Trisaccharid **72** in einer Ausbeute von 47% führte. Dieses weist strukturelle Verwandtschaft mit Muzinstrukturen auf und könnte deshalb zur Untersuchung von tumorrelevanten Kohlenhydratfunktionen als auch für die Entwicklung von Tumorimpfstoffen von Interesse sein.

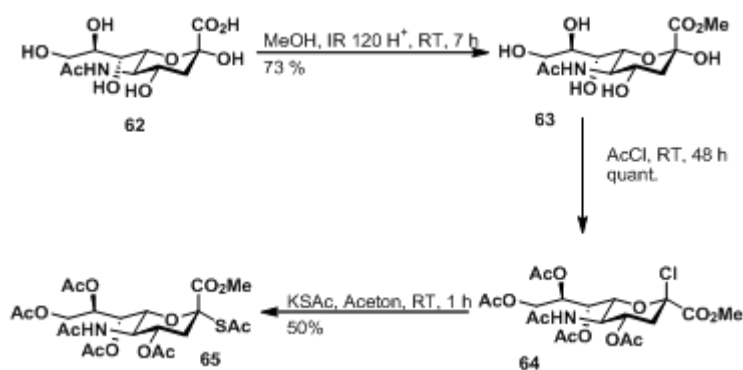
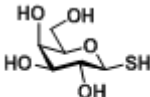
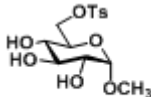
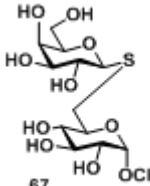
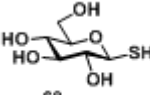
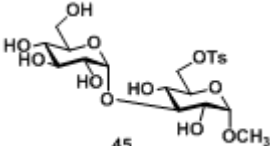
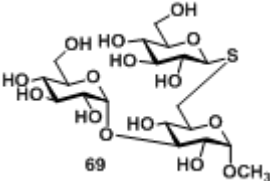
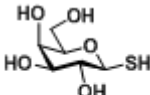
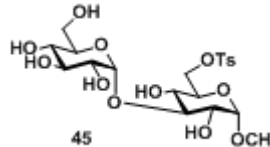
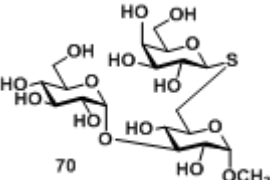
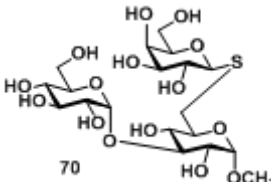
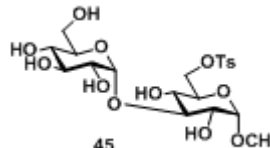
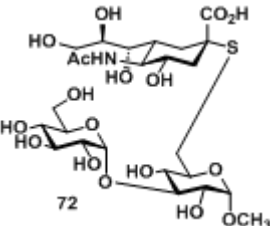


Abbildung 6-9: Synthese des Neuraminsäurethiols **65**.

Tabelle 6-3: Synthese der Methyl-Thiooligosaccharide **67**, **69**, **70** und **72**.

Donor	Akzeptor	Produkt	Ausbeute [%]
 66	 44	 67	90
 68	 45	 69	87
 66	 45	 70	91
 70	 45	 72	47

6.2.5 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen **65**, **67**, **69**, **70** und **72**

Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **65** resoniert H-3_a als Multiplett bei $\delta = 2.01$ und H-3_e als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 2.56$ mit Kopplungskonstanten von $J = 12.9$ und 4.6 Hz. H-4 resoniert als Dublett eines Dubletts eines Dubletts bei $\delta = 4.84$ mit Kopplungskonstanten von $J = 11.7$, 10.5 und 4.6 Hz. H-5 resoniert als Multiplett bei $\delta = 4.06$ und H-6 als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 4.60$ mit Kopplungskonstanten von $J = 10.8$ und 2.4 Hz. H-7 resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 5.30$ mit Kopplungskonstanten von $J = 6.3$ und 2.4 Hz. H-8 resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 5.16$ mit Kopplungskonstanten von $J = 6.3$ und 2.5 Hz. H-9_a resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 4.36$ mit Kopplungskonstanten von $J =$

12.4 und 2.5 Hz. H-9_b resoniert als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.96$ mit Kopplungskonstanten von $J = 12.4$ und 6.3 Hz. Die vier O-Acetylgruppen resonieren als Singulett bei $\delta = 2.07, 2.05, 1.96$ und 1.95 , die N-Acetylgruppe als Singulett bei $\delta = 1.81$ und die eingeführte S-Acetylgruppe als Singulett bei $\delta = 2.21$. Die NH-Gruppe resoniert als Dublett bei $\delta = 5.38$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 10.0$ Hz. Die Protonen des Methylesters resonieren als Singulett bei $\delta = 3.72$ (siehe Abbildung 6-10).

Im ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **65** resoniert die S-Acetylgruppe erwartungsgemäß tieffeldverschoben bei $\delta = 191.67$ für das Carbonylkohlenstoffatom und ebenfalls tieffeldverschoben bei $\delta = 29.94$ für die Methylgruppe. C-1 sowie die Carbonylkohlenstoffatome der O- und N-Acetylgruppen resonieren bei $\delta = 170.66$ - 169.29 . Die Methylgruppen der O- und N-Acetylgruppen resonieren bei $\delta = 22.95$ - 20.63 . Das Signal für C-2 lässt sich bei 84.34 erkennen.

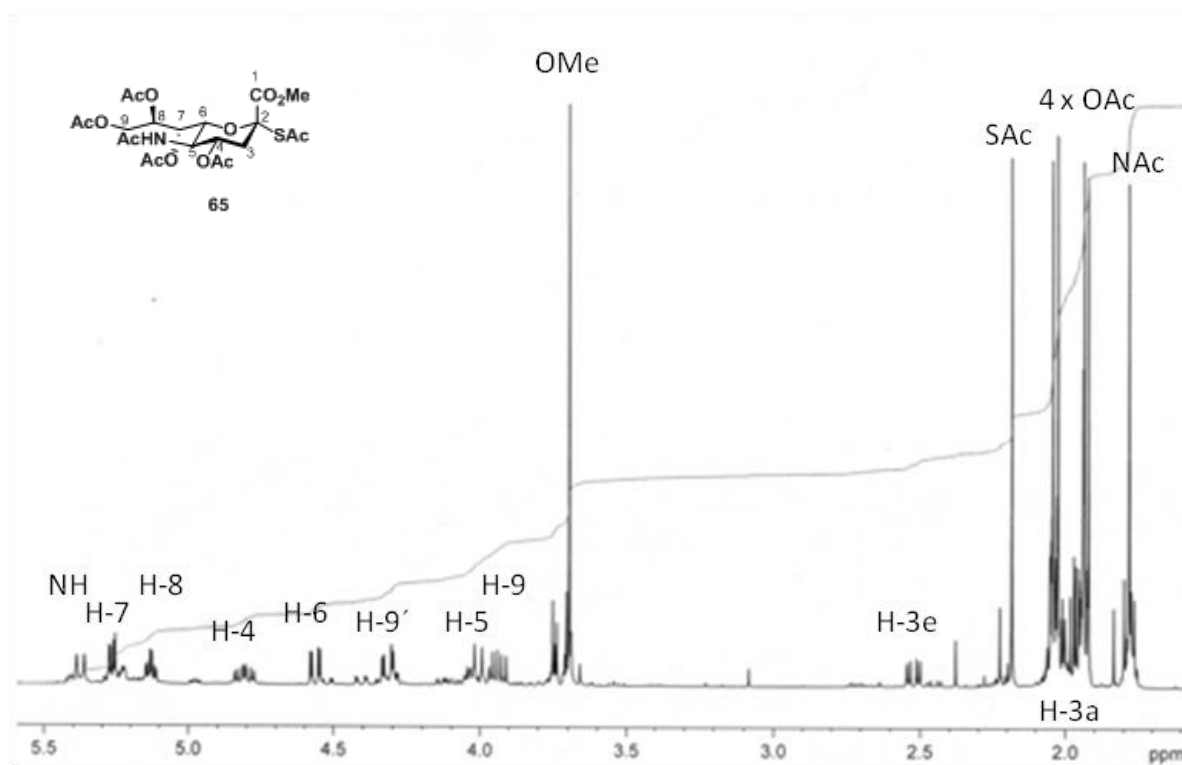


Abbildung 6-10: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **65** (400 MHz, CDCl_3).

Die chemischen Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum für C-6 der Verbindungen **67**, **69** und **70** sind deutlich hochfeldverschoben bei $\delta = 34.19, 34.11$ und 34.04 zu erkennen, was die

thioglykosidische α -1,6-Verknüpfung bestätigt. Die Signale für H-1' der Verbindungen **67**, **69** und **70** resonieren im ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 4.56$, 4.50 und 4.56 mit den aufgrund der Thioverknüpfung erhöhten Kopplungskonstanten von $J = 9.9$, 9.7 und 9.9 Hz. was das Vorliegen von thioglykosidischen β -1,6-Verknüpfungen anzeigt. Die Protonen der Methoxygruppe zeigen ein charakteristisches Singulett im ^1H -NMR-Spektrum aller drei Verbindungen bei $\delta = 3.38$ und die entsprechenden Kohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum ein Signal bei $\delta = 58.1$. Bei Verbindung **67** lässt sich das Signal für C-1 bei $\delta = 102.06$ und für C-1' hochfeldverschoben bei $\delta = 88.88$ erkennen, was das Vorliegen der thioglykosidischen Verknüpfung nochmals bestätigt. Die Protonen H-6 resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.16$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.5$ und 14.2 Hz für H-6_a und bei $\delta = 2.88$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.8$ und 14.2 Hz für H-6_b.

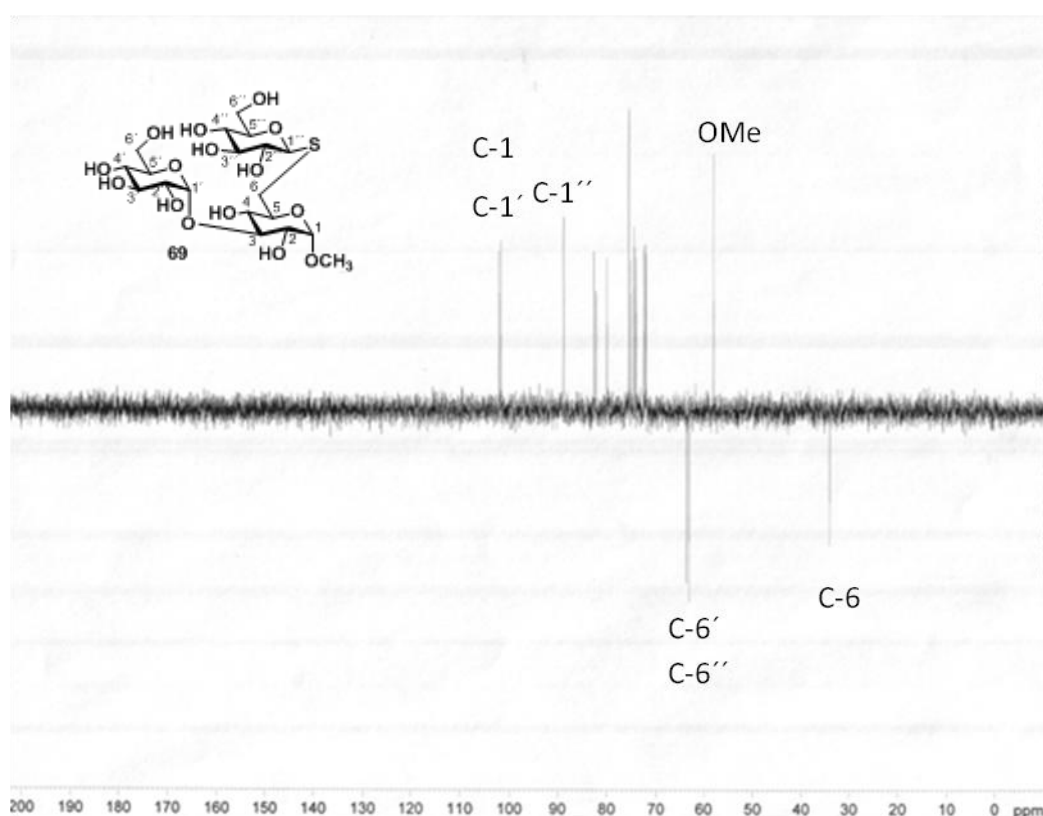


Abbildung 6-11: ^{13}C -DEPT-NMR Spektrum von Verbindung **69** (100 MHz, D_2O).

Bei Verbindung **69** lässt sich das Signal für C-1 im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 101.81$ und für C-1' hochfeldverschoben bei $\delta = 89.40$ erkennen, was das Vorliegen der thioglykosidischen Verknüpfung nochmals bestätigt. Das Signal für C-1'' resoniert bei $\delta = 102.20$ (siehe Abbildung 6-11). Die Protonen H-6 resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als

Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.16$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.5$ und 14.3 Hz für H_{6a} und bei $\delta = 2.89$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.1$ und 14.3 Hz für H_{6b} . Bei Verbindung **70** lässt sich das Signal für C-1 bei $\delta = 101.80$ und für C-1' hochfeldverschoben bei $\delta = 88.88$ finden, was das Vorliegen der thioglykosidischen Verknüpfung bestätigt. Das Signal für C-1'' resoniert bei $\delta = 102.19$. Die Protonen H-6 resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.17$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.5$ und 14.2 Hz für H_{6a} und bei $\delta = 2.90$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.0$ und 14.2 Hz für H_{6b} (siehe Abbildung 6-12). Die N-Acetylgruppe von Verbindung **72** resoniert als Singulett bei $\delta = 2.17$. Die Verbindungen **67**, peracetyliertes **69** und **70** zeigen im ESI-Massenspektrum einen Basispeak bei $m/z = 690$, 557 bzw. 557 für das jeweilige Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$ und Verbindung **72** einen Basispeak bei $m/z = 731.3$ für das Konjugat $[\text{M}+3\text{Na}]^+$.

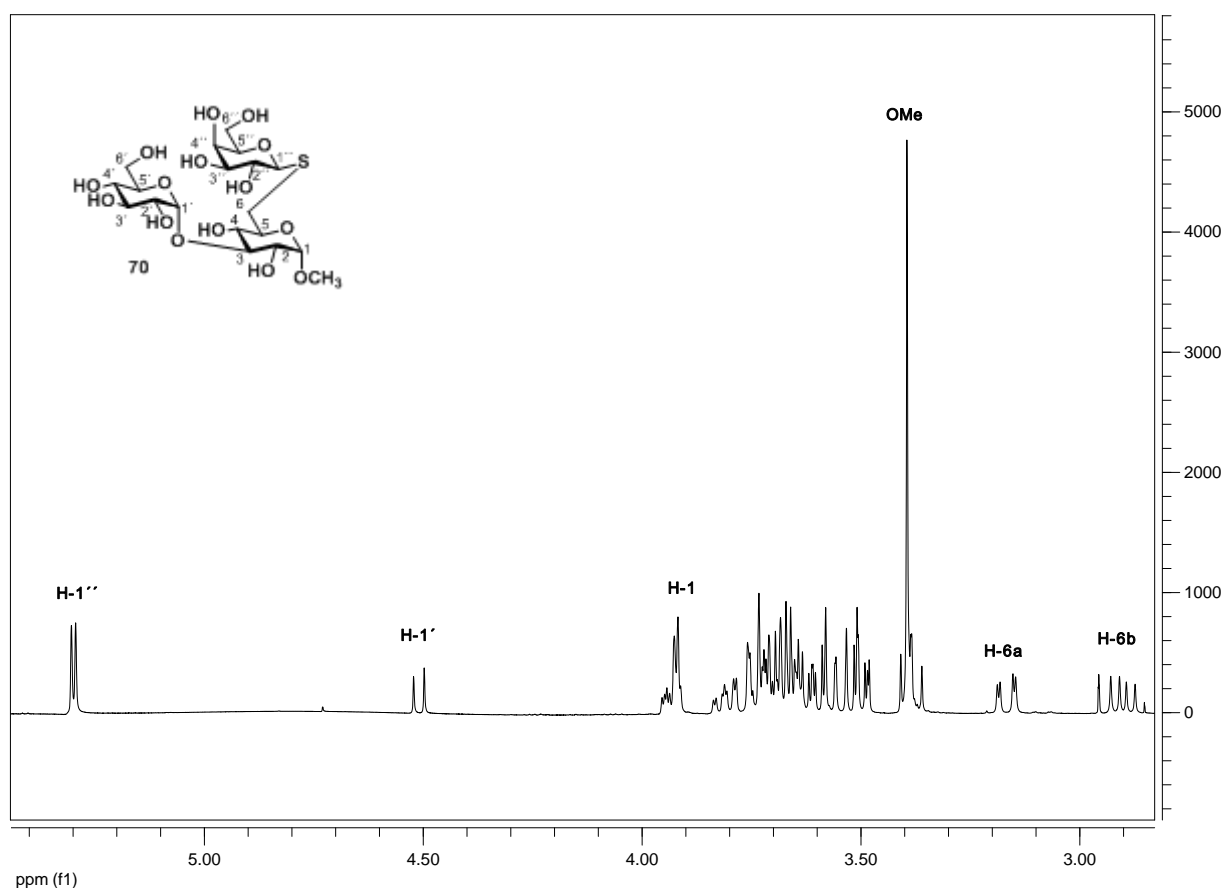


Abbildung 6-12: ^1H -NMR Spektrum von Verbindung **70** (400 MHz, D_2O).

6.2.6 Allyl-Thiooligosaccharide

Um die synthetisierten Oligosaccharide am reduzierenden Ende erweitern zu können, sollten neben den Methylglykanen auch die Allylglykane durch chemische Substitution erweitert werden. Die Allylgruppe kann in ein Aldehyd oder ein Amin durch Ozonolyse bzw. photochemische Addition von Cysteamin umgewandelt werden. So bietet sich die Möglichkeit, das Kohlenhydrat mit Aglykonen wie Peptiden, Natur- und Wirkstoffen oder Festphasen wie Mikroarrays ohne Einführung von Schutzgruppen zu verknüpfen, um Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zu untersuchen (siehe Abbildung 6-13).

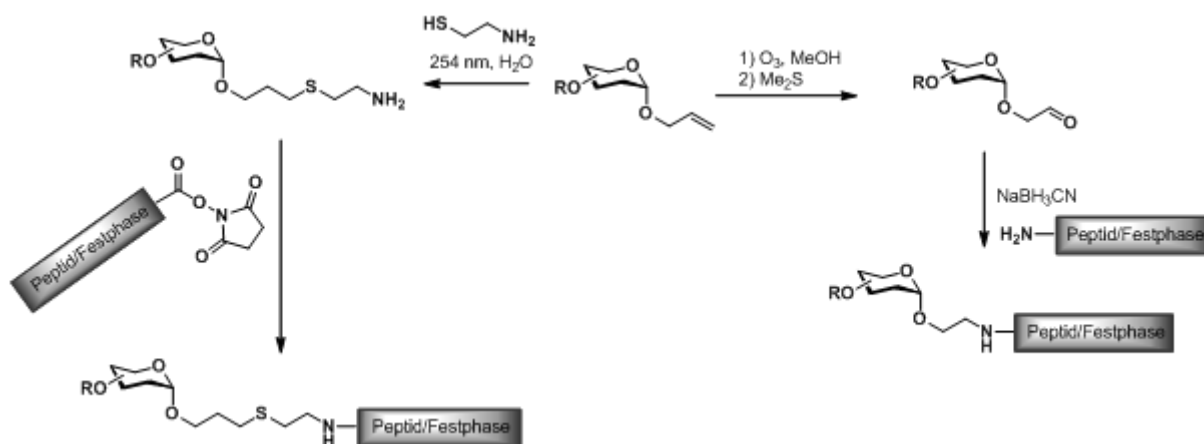
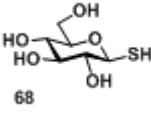
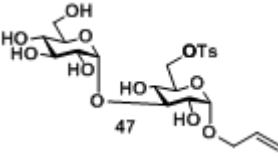
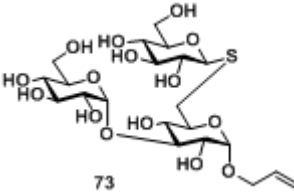
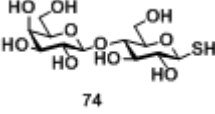
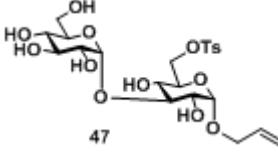
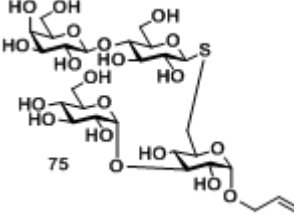


Abbildung 6-13: Möglichkeiten zur Anbindung der Allylglykoside an Peptide oder Festphasen.

Die Umsetzung von Thioglukose **68** mit dem tosylierten Disaccharid **47** lieferte **73** in einer sehr guten Ausbeute von 90%. Die Darstellung eines komplexen Tetrasaccharids **75** gelang durch Umsetzung von Thiolaktose **74** mit dem tosylierten Disaccharid **47** in einer Ausbeute von 58%.

Tabelle 6-4: Synthese der Allyl-Thiooligosaccharide.

Donor	Akzeptor	Produkt	Ausbeute [%]
 68	 47	 73	90
 74	 47	 75	58

6.2.7 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen **73** und **75**

Die Signale für C-6 der Verbindungen **73** und **75** lassen sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 33.76$ bzw. 33.91 erkennen. Die Protonen H-1' der Verbindungen **73** und **75** resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 4.59$ bzw. 4.61 mit einer Kopplungskonstante von jeweils $J = 9.9$ Hz, was das Vorliegen einer thioglykosidischen β -1,6-Verknüpfung bestätigt. Die Allylgruppe zeigt bei beiden Verbindungen die charakteristischen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum. Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **73** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.98, 5.38, 5.26, 4.27$ und 4.07 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.19, 121.19$ und 71.17 . Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **75** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 6.03, 5.48\text{--}5.39, 5.31, 4.31$ und 4.11 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.72, 121.35$ und 71.20 . Bei Verbindung **73** resoniert C-1' hochfeldverschoben bei $\delta = 88.65$, was das Vorliegen der thioglykosidischen Verknüpfung nochmals bestätigt. H-1 resoniert im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 4.90$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.8$ Hz und H-1'' bei $\delta = 5.33$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.9$ Hz, was in beiden Fällen die α -glykosidische Verknüpfung bestätigt (siehe Abbildung 6-14).

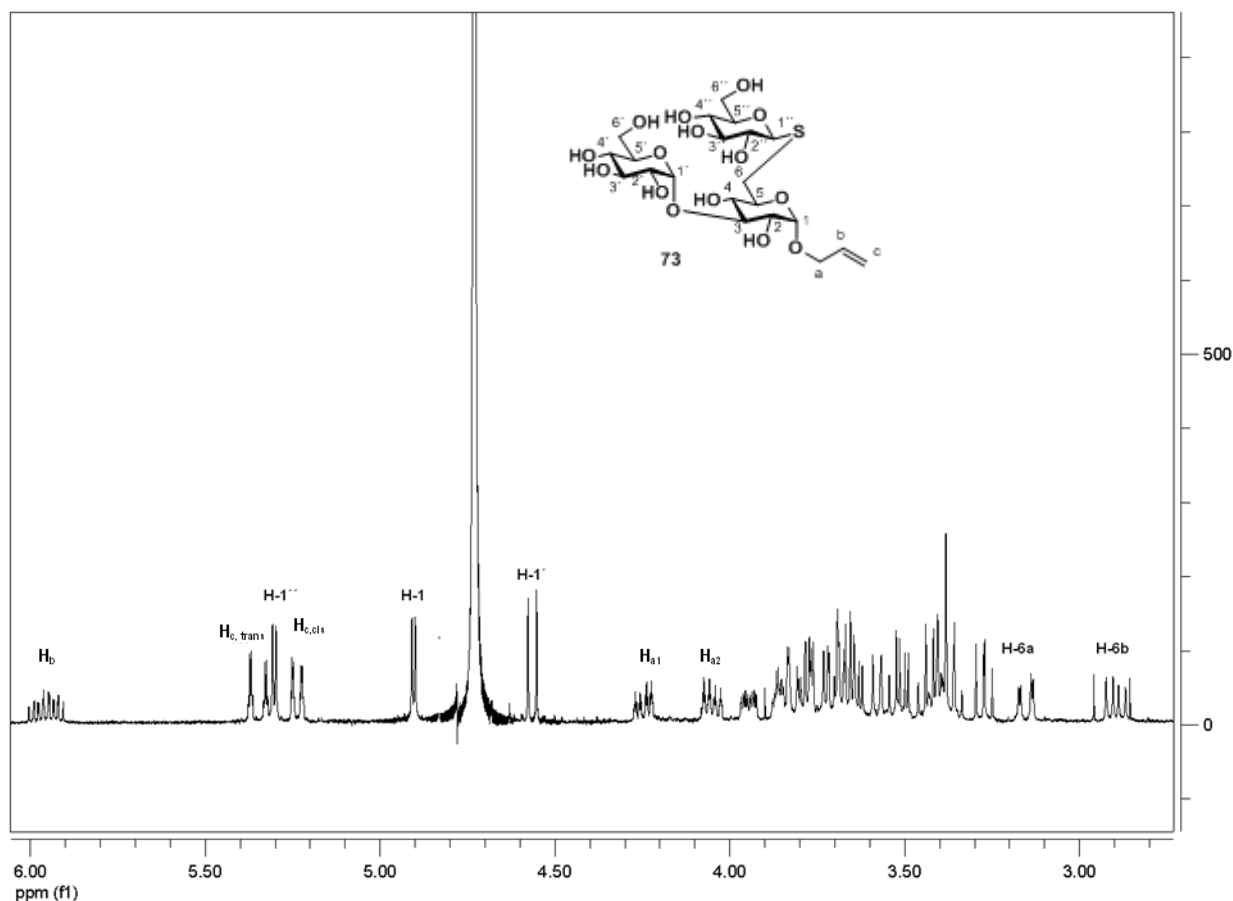


Abbildung 6-14: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **73** (600 MHz, D_2O).

C-1 resoniert im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 99.91$ und C-1' bei $\delta = 101.77$. C-6' und C-6'' resonieren bei $\delta = 63.66$ und 63.13 (siehe Abbildung 6-15). Bei Verbindung **75** lässt sich das Signal für C-1' hochfeldverschoben bei $\delta = 88.54$ erkennen, was das Vorliegen der thiolglykosidischen Verknüpfung bestätigt. C-1'' resoniert bei $\delta = 105.97$, C-1''' bei $\delta = 102.08$ und C-1 bei $\delta = 100.21$. C-6', C-6'' und C-6''' resonieren bei $\delta = 63.96$, 63.51 und 63.26 . Beide H-6-Protonen resonieren im ^1H -NMR-Spektrum jeweils als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.18$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.5$ und $J = 4.2$ Hz und bei $\delta = 2.92$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.0$ und 14.2 Hz. Bei Verbindung **75** resonieren beide H-6 jeweils als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.20$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.2$ und 14.1 Hz und bei $\delta = 2.93$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.0$ und 14.1 Hz. Die Hochfeldverschiebung von H-6 bestätigt die thiolglykosidische Verknüpfung an C-6. Die ESI-Massenspektren von **73** und **75** zeigen einen Basispeak bei $m/z = 583$ bzw. 745 für das jeweilige Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

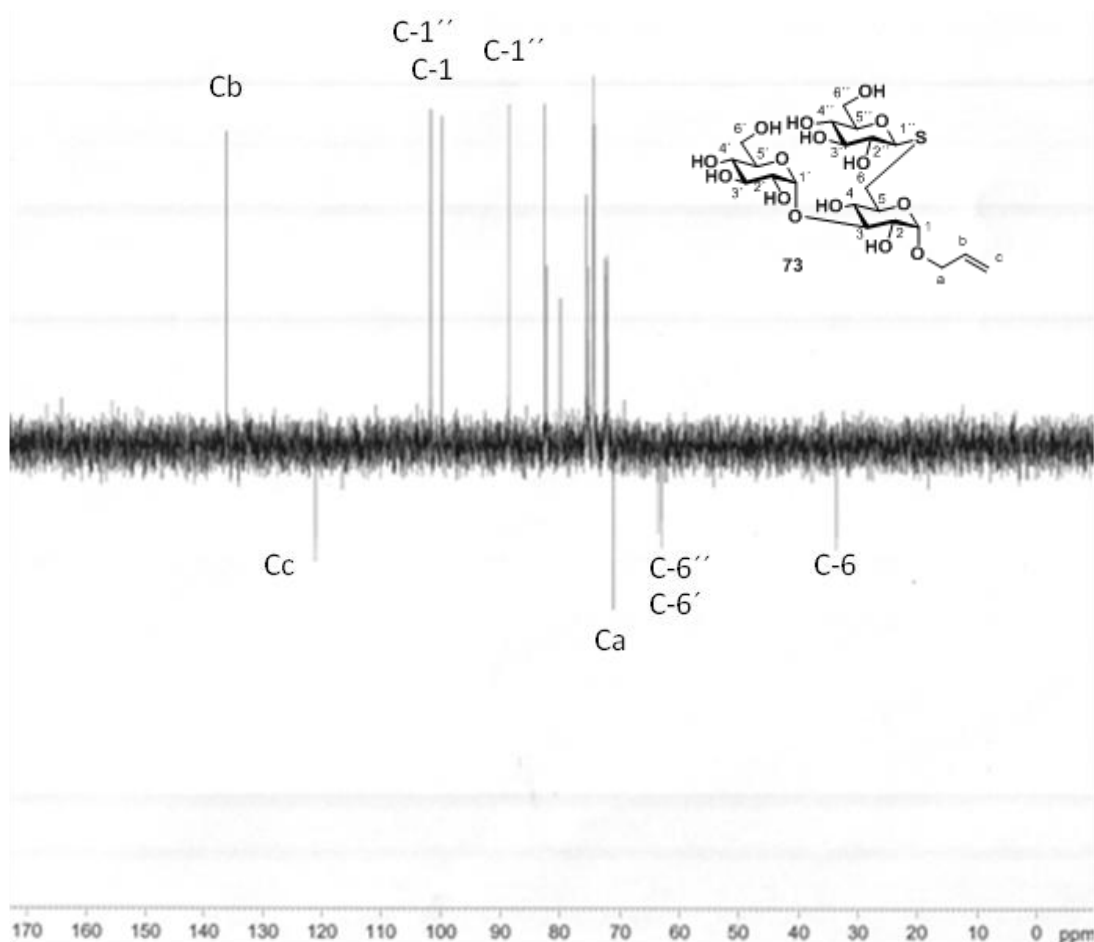


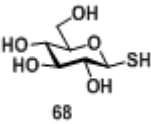
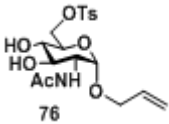
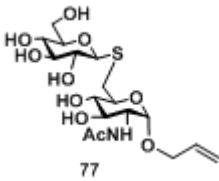
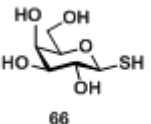
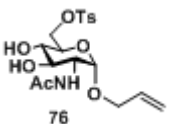
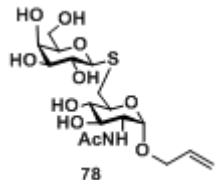
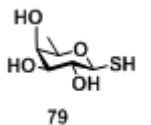
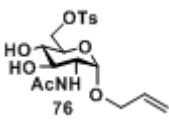
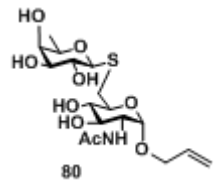
Abbildung 6-15: ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum von Verbindung **73** (150 MHz, D_2O).

6.2.8 GlcNAc-Thiooligosaccharide

Nach der erfolgreichen Darstellung verschiedener mit Glukose in Position 6 verknüpfter Thiooligosaccharide sollte die Übertragung auf weitere Monosaccharide erfolgen. Eng verwandt mit der Glukose ist N-Acetylglukosamin. N-Acetylglukosamin kommt in zahlreichen Oligosacchariden vor und ist beispielsweise Bestandteil von Bakterienzellwänden als auch ein Grundbaustein der Blutgruppenantigene. Ferner sind die meisten N-Glykane über N-Acetylglukosamin mit Asparaginseitenketten von Proteinen verknüpft. Die Modulierung von Transkriptionsfaktoren mit N-Acetylglukosamingruppen (O-GlcNAcylierung) beeinflusst dadurch die Transkription von Genen.^[151] Außerdem bewirkt die O-GlcNAcylierung die Lokalisierung und Aktivierung von Enzymen und ist mit Diabetes oder neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert.^[3]

Es sollten also verschiedene Thiooligosaccharide auf N-Acetylglukosamin übertragen werden. Analog zur Glukose sollte hierbei eine Substitution an C-6 ebenfalls möglich sein. N-Acetylglukosamin wurde dafür zunächst allyliert, in Position 6 tosyliert und anschließend mit 1-Thio-Monosacchariden analog zur Synthese von **73** und **75** umgesetzt. So erfolgte die Darstellung der Disaccharide **77**, **78** und **80** in Ausbeuten von 47%, 20% bzw. 40%.

Tabelle 6-5: Synthese der GlcNAc-Thiooligosaccharide.

Donor	Akzeptor	Produkt	Ausbeute [%]
 68	 76	 77	47
 66	 76	 78	20
 79	 76	 80	40

6.2.9 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen **77**, **78** und **80**

In den ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindungen **77**, **78** und **80** konnte die Thioverknüpfung an den charakteristischen hochfeldverschobenen Signalen von C-6 nachgewiesen werden. C-6 für **77**, **78** und **80** resoniert bei $\delta = 34.09$, 34.15 bzw. 33.80 . Die H-1'-Protonen resonieren als Dubletts bei $\delta = 4.65$, 4.60 bzw. 4.50 mit erhöhten Kopplungskonstanten von $J = 9.8$, 9.6 bzw. 9.7 Hz, was charakteristisch für eine β -glykosidische Verknüpfung ist. Die Signale für C-2 im ^{13}C -NMR-Spektrum lassen sich bei $\delta = 56.52$, 56.52 bzw. 56.53 erkennen. Die charakteristischen Signale der N-Acetylgruppe lassen sich bei allen drei Verbindungen bei $\delta =$

177.3 für das Carbonylkohlenstoffatom und bei $\delta = 23.4$ für die Methylgruppe finden. Die Protonen der Acetylgruppe resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 2.1$. Die anomeren Protonen H-1 resonieren als Dubletts bei $\delta = 4.93$, 4.93 und 4.92 mit entsprechenden Kopplungskonstanten von $J = 3.7$, 3.7 und 3.6 Hz, was charakteristisch für die α -Allylgruppe ist. Die Signale der Kohlenstoffatome C-6' der Verbindungen **77** und **78** lassen sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 63.79$ und $\delta = 63.97$ erkennen. Die Kohlenstoffatome C-1 der Verbindungen **77**, **78** und **80** resonieren bei $\delta = 98.75$, 98.75 bzw. 98.75 . C-1' resoniert hochfeldverschoben bei $\delta = 88.75$, 89.31 bzw. 88.32 , was die thioglykosidische Bindung bestätigt. Bei Verbindung **77** resonieren beide H-6-Protonen im ^1H -NMR-Spektrum jeweils als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.26$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.5$ und 14.1 Hz für H-6_a und bei $\delta = 3.01$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.1$ und 14.1 Hz für H-6_b (siehe Abbildung 6-16).

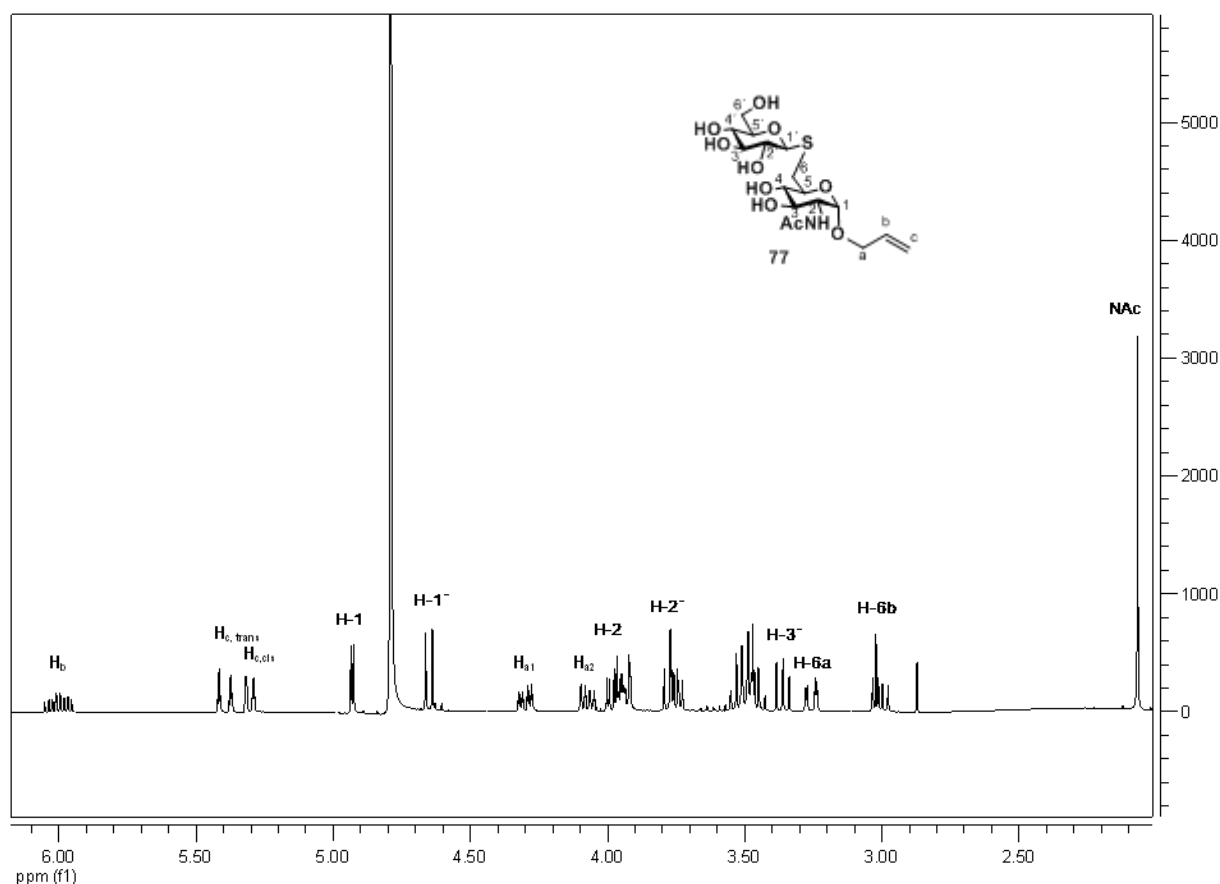


Abbildung 6-16: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **77** (400 MHz, D_2O).

Bei Verbindung **78** resonieren beide H-6-Protonen jeweils als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.26$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.6$ und 14.2 Hz für H-6_a und bei $\delta = 3.02$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.0$ und 14.2 Hz für H-6_b. Die Hochfeldverschiebung der H-6-Protonen kommt durch das benachbarte Schwefelatom zustande. Bei Verbindung **80** resonieren beide H-6-Protonen jeweils als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 3.28$ mit den Kopplungskonstanten $J = 2.4$ und 14.2 Hz für H-6_a und bei $\delta = 2.88$ mit den Kopplungskonstanten $J = 8.3$ und 14.2 Hz für H-6_b. Die CH₃-Gruppe der Fukoseeinheit von Verbindung **80** resoniert im ¹H-NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 1.26$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 6.5$ Hz (siehe Abbildung 6-17).

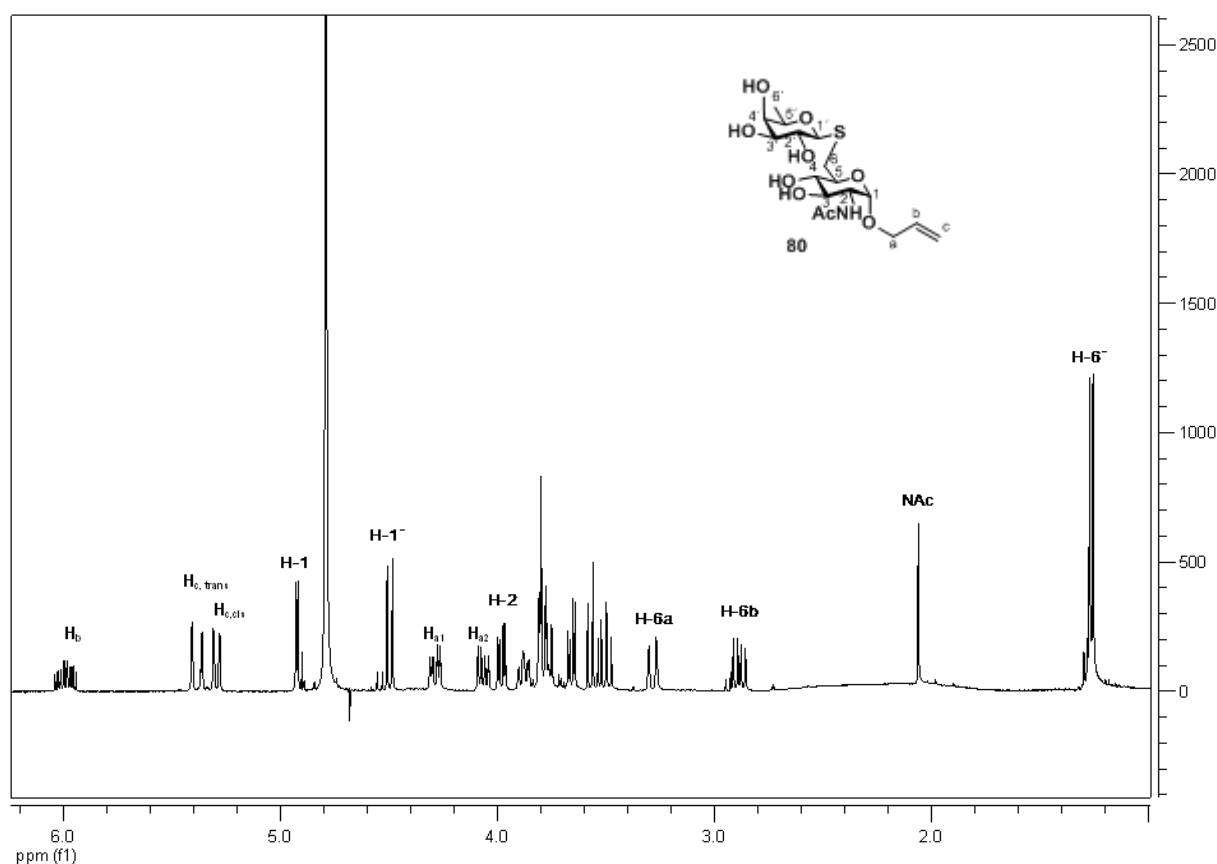


Abbildung 6-17: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **80** (400 MHz, D₂O).

Das entsprechende Signal im ¹³C-NMR-Spektrum lässt sich bei $\delta = 18.59$ finden. Die Allylgruppe zeigt bei allen Verbindungen die charakteristischen Signale im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum. Im ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **77** resonieren die Allyl-Protonen H_b, H_{c,trans}, H_{c,cis}, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 6.00$, 5.39 , 5.30 , 4.30 und 4.07 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b, C_c und C_a resonieren im ¹³C-NMR-Spektrum bei $\delta = 136.44$, 120.94 und

71.32. Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **78** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 6.00$, 5.40 , 5.30 , 4.30 und 4.07 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.44$, 120.89 und 71.32 . Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **80** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.99$, 5.38 , 5.29 , 4.29 und 4.07 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.43$, 120.89 und 71.26 . Das ESI-Massenspektrum der Verbindung **80** zeigt einen Basispeak bei $m/z = 583$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.2.10 Synthese an C-2 und C-3 tosylierter Glukosederivate

Mit den bisherigen Bausteinen konnte bereits einer Anzahl diverser Oligosaccharide dargestellt werden. Zahlreiche Thiozucker wurden auf die zwei Kernbausteine, nämlich Glukose und Galaktosamin, in α -1,6-Verknüpfung übertragen. Die Diversität sollte darüberhinaus sowohl hinsichtlich des Kernbausteins als auch hinsichtlich der Verknüpfungsmöglichkeiten erweitert werden. Der $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus der Substitution bietet die Möglichkeit, die Stereochemie am Tosyl-substituierten Kohlenstoffatom umzukehren. Auch wenn die Substitution der Tosylgruppe in Position 6 keine Auswirkung auf die Stereochemie des Bausteins hatte, sollte die Substitution der Tosylgruppe an einer anderen Position am Zucker eine Umkehr der Konfiguration induzieren können und damit die Möglichkeit bieten, die Diversität der entstehenden Oligosaccharide zu erhöhen. Es wurden zwei weitere Tosyl-substituierte Glukosebausteine synthetisiert. Hierfür wurden zunächst die Hydroxylgruppen an C-4 und C-6 von Allylglukose mit einer Benzylidenschutzgruppe geschützt. Die anschließende Tosylierung lieferte sowohl in Position 2 als auch in Position 3 tosylierte Allylglukose, welche säulenchromatographisch getrennt werden konnten. Anschließend wurde die Benzylidenschutzgruppe durch saure Katalyse mit Essigsäure abgespalten. Es entstand bevorzugt das in Position 2 tosylierte Derivat, da die Position 2 aufgrund der höheren Azidität der 2-Hydroxylgruppe reaktiver als Position 3 ist. Die Azidität der 2-Hydroxylgruppe wird durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung von der 2-Hydroxylgruppe zur α -C-1-Allylgruppe erhöht.^[152] Die Stellung der Hydroxylgruppen (axial oder äquatorial) scheint hingegen keinen Einfluss auf die Regioselektivität zu haben, da die Tosylierung von Methyl 4,6-*O*-benzyliden- α -D-mannopyranosid ebenfalls bevorzugt in Position 2 erfolgt.^[153]

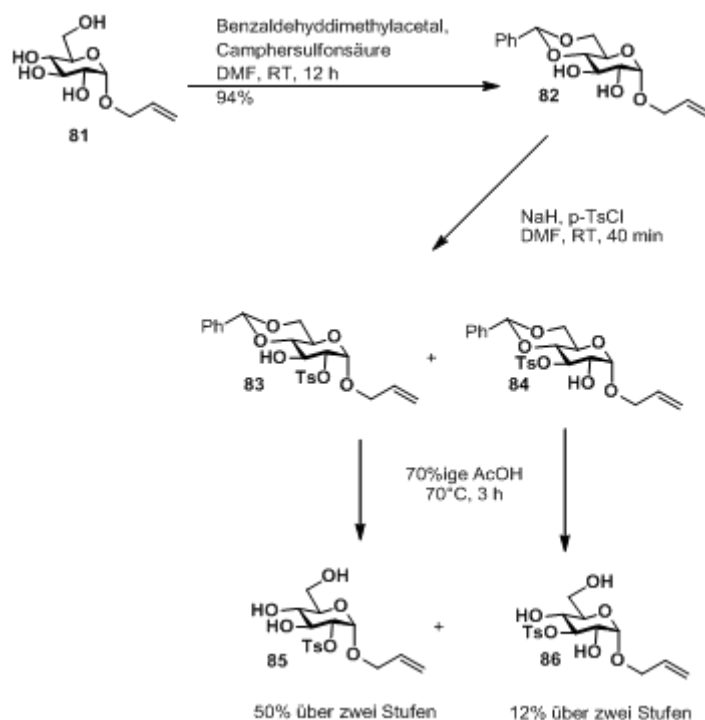


Abbildung 6-18: Synthese an unterschiedlichen Positionen tosylierter Glukosebausteine **85** und **86** zur Erhöhung der Diversität.

6.2.11 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen **82**, **85** und **86**

Die Einführung der Benzylidengruppe bei Verbindung **82** konnte mithilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Im ^1H -NMR-Spektrum resoniert H-1 als Dublett bei $\delta = 4.81$ mit einer für die α -Allylgruppe charakteristischen Kopplungskonstante von $J = 3.9$ Hz. Das benzyliche Proton resoniert als Singulett bei $\delta = 5.43$. Die fünf aromatischen Protonen der Benzylidengruppe resonieren als Multipletts bei $\delta = 7.42$ und $\delta = 7.35$ - 7.21 . Im ^{13}C -NMR-Spektrum lässt sich ein Signal für C-1 bei $\delta = 97.87$ finden. Das Signal der benzylichen CH-Gruppe lässt sich bei $\delta = 101.81$, das des quartären aromatischen Kohlenstoffatoms bei $\delta = 137.01$ und das der fünf aromatischen CH-Gruppen bei $\delta = 129.15$, $\delta = 128.24$, $\delta = 126.28$ finden. Die Allylgruppe zeigt die charakteristischen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.84$, 5.24 , 5.15 , 4.14 und 3.95 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 133.32$, 118.17 und 68.81 .

Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **85** resoniert H-1 als Dublett bei $\delta = 4.85$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.7$ Hz, welche charakteristisch für die α -Allylgruppe ist. Die

vier Protonen der Tosylgruppe resonieren als Multipletts bei $\delta = 7.85\text{--}7.81$ und bei $\delta = 7.45\text{--}7.42$. Das Signal für C-1 lässt sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 96.58$ und das der quartären C-Atome der Tosylgruppe bei $\delta = 146.49$ und 135.12 erkennen. Die vier CH-Gruppen der Tosylgruppe resonieren bei $\delta = 130.90$ und $\delta = 129.08$. Die Methylgruppe der Tosylgruppe resoniert im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 2.46$ und im ^{13}C -NMR bei $\delta = 21.61$. C-2 resoniert bei $\delta = 81.28$ und C-3 bei $\delta = 71.99$. Die Allylgruppe zeigt die charakteristischen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.84$, 5.29 , 5.16 , 4.14 und $3.86\text{--}3.79$. Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 134.85$, 117.79 und 69.31 .

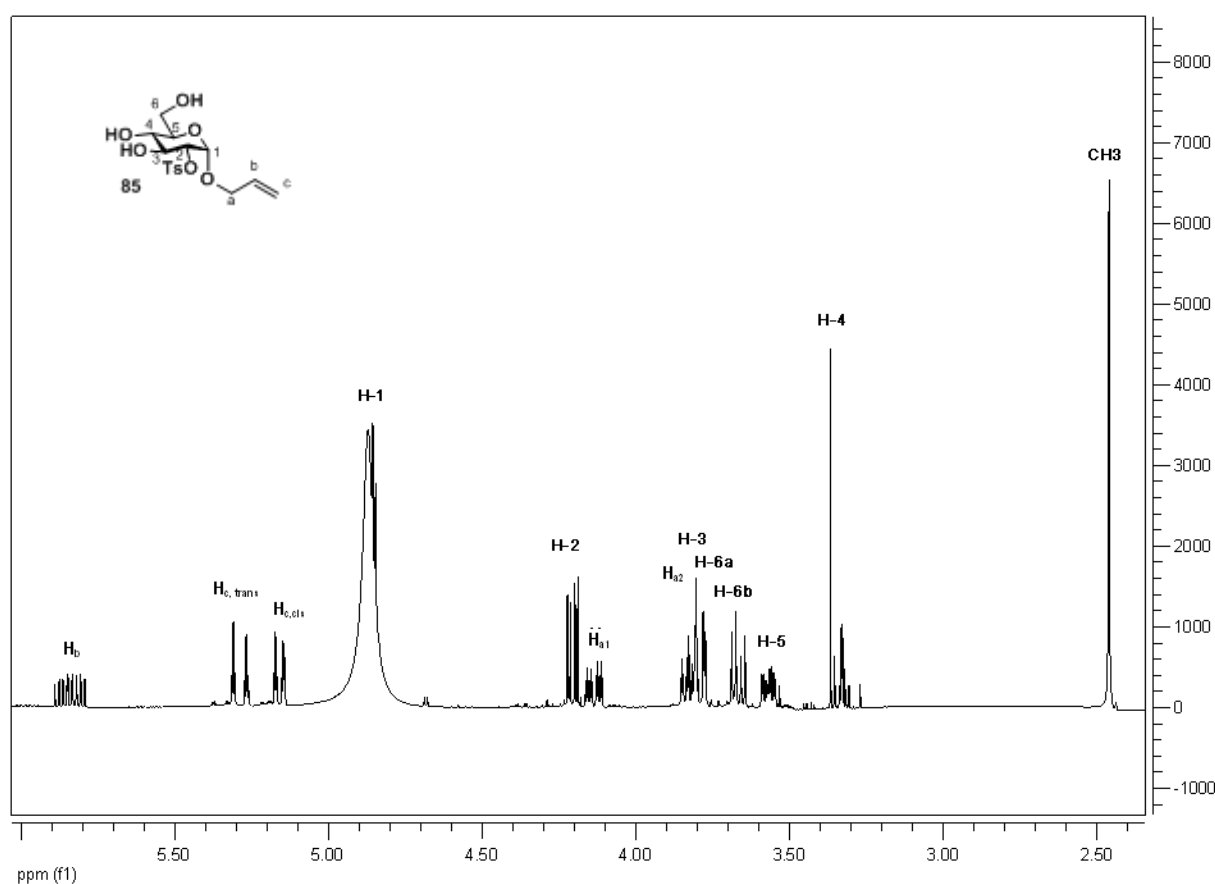


Abbildung 6-19: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **85** (400 MHz, CD_3OD).

Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **86** resoniert H-1 als Dublett bei $\delta = 4.98$ mit einer für die α -Allylgruppe charakteristischen Kopplungskonstante von $J = 3.5$ Hz. Die vier Protonen der Tosylgruppe resonieren als zwei Multipletts bei $\delta = 7.83\text{--}7.73$ und bei $\delta = 7.70\text{--}7.66$. C-1 resoniert im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 96.61$. Die Signale der quartären C-Atome der

Tosylgruppe lassen sich bei $\delta = 146.87$ und $\delta = 146.13$ finden. Die Signale der CH-Gruppen der Tosylgruppe lassen sich bei $\delta = 131.06$, 130.73 , 129.36 und 129.24 finden. Die Protonen der Methylgruppe der Tosylgruppe resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 2.46$ (siehe Abbildung 6-19) und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 21.67$. C-2 resoniert bei $\delta = 77.58$ und C-3 bei $\delta = 81.90$. Die Allylgruppe zeigt die charakteristischen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.88$, 5.31 , 5.20 , 4.16 und 3.88 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 134.69$, 118.28 und 69.71 .

Selbst mithilfe der Korrelationsspektroskopie konnte nicht festgestellt werden, ob sich die Tosylgruppe an C-2 oder an C-3 befindet. Deshalb wurden die chemischen Verschiebungen der Ring-Kohlenstoffatome der monotosylierten Verbindungen **85** und **86** im ^{13}C -NMR-Spektrum mit denen von unsubstituierter Allylglukose **81** verglichen. Es stellte sich heraus, dass bei Verbindung **85** die chemische Verschiebung am meisten für C-2 abwich, gefolgt von C-1 und C-3, wohingegen an C-4, C-5 und C-6 kaum eine Differenz zu beobachten war (siehe Abbildung 6-20). Dies ließ darauf schließen, dass es sich bei Verbindung **85** um das an C-2 tosylierte Molekül handelte.

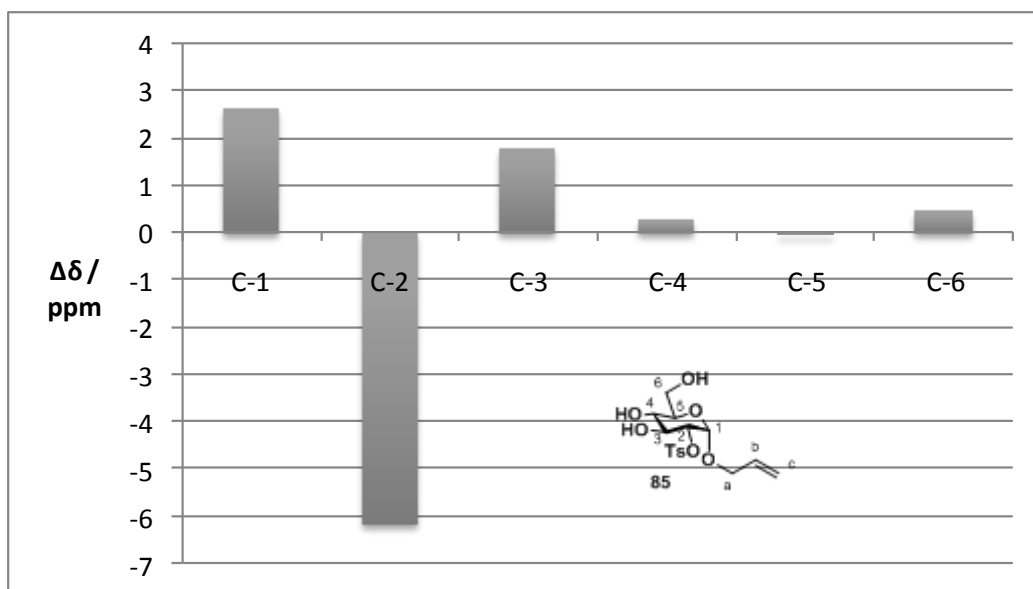


Abbildung 6-20: Unterschiede der chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta/\text{ppm}$) im ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CD_3OD) zwischen Allylglukose **81** und **85**.

Bei Verbindung **86** wich die chemische Verschiebung an C-3 am stärksten ab, gefolgt von C-4, C-2 und C-1, wohingegen die Differenz an C-5 und C-6 nur minimal war (siehe Abbildung 6-21). Dies ließ darauf schließen, dass es sich hierbei um das an C-3 tosylierte Molekül handelte.

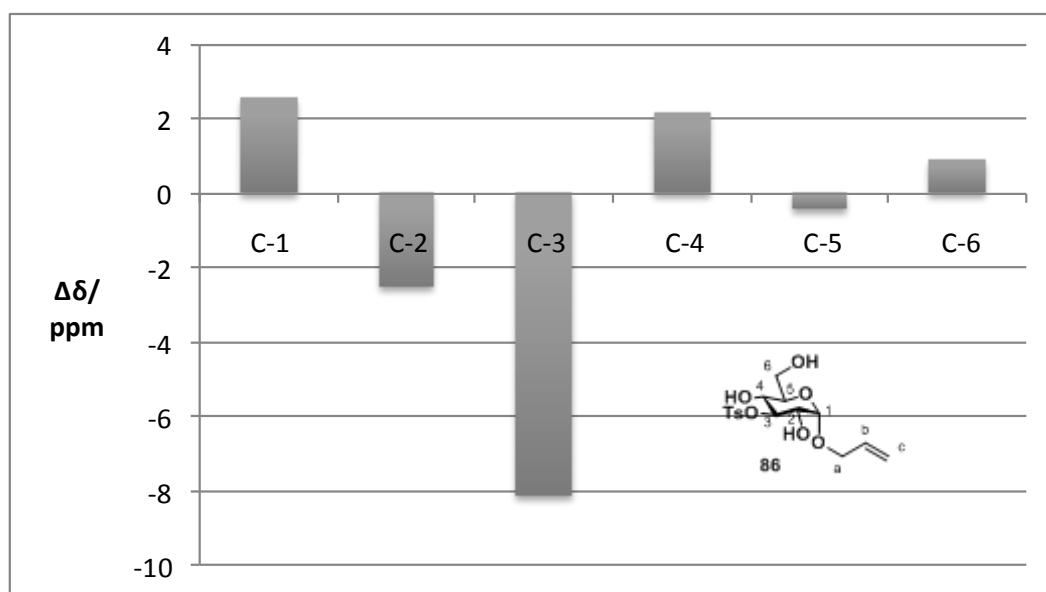


Abbildung 6-21: Unterschiede der chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$ /ppm) im ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CD_3OD) zwischen Allylglukose **81** und **86**.

6.2.12 Synthese S-(1,3) verknüpfter Glykoside

Die äquatoriale Tosyl-Gruppe in Position 3 von Verbindung **86** sollte mit Thiozuckern unter Umkehr der Konfiguration substituiert werden. Dadurch sollte sich die Stereochemie an C-3 dahingehend ändern, dass der neue Substituent axial anstatt äquatorial gebunden ist.

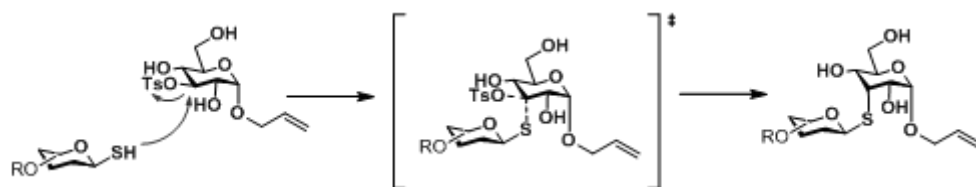
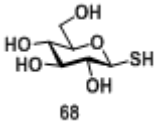
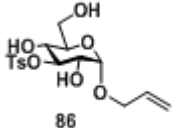
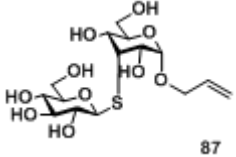
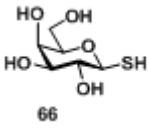
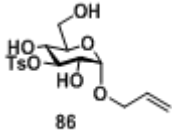
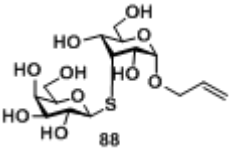
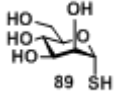
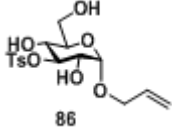
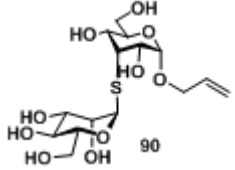
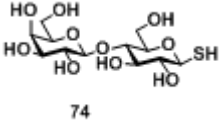
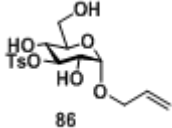
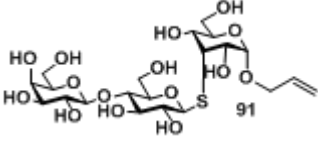


Abbildung 6-22: Erzeugung von Alloose aus Glukose durch $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion.

Somit sollte aus 3-Tosylglukose an Position 3 verknüpfte Allose entstehen. Es konnten mit dieser Methode Glukose, Galaktose und Laktose β -1,3- und Mannose α -1,3-thioglykosidisch auf die zu Allose transformierte Glukose übertragen werden.

Tabelle 6-6: Synthese der Mannose-Thiooligosaccharide.

Donor	Akzeptor	Produkt	Ausbeute [%]
 68	 86	 87	30
 66	 86	 88	34
 89	 86	 90	21
 74	 86	 91	13

6.2.13 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 87, 88, 90 und 91

Der Strukturbeweis der Verbindungen **87**, **88**, **90** und **91** gelang mithilfe der Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie. Das ESI-Massenspektrum zeigt für **87**, **88** und **90** bei $m/z = 421$ bzw. für **91** bei $m/z = 583$ einen Basispeak, welcher jeweils als $[M+Na]^+$ -Konjugat interpretiert werden kann. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Übertragung der Thiozucker stattgefunden hat. Die anomeren Protonen H-1 resonieren bei $\delta =$

4.81 für **87**, **88** und **90** und bei $\delta = 4.83$ für **91** als Dubletts mit einer Kopplungskonstante von $J = 2.4$ Hz für **87** und **91**, von $J = 2.6$ Hz für **88** und von $J = 4.3$ Hz für **90**. Die im Vergleich zur unsubstituierten Allylglukose erhöhten Kopplungskonstanten kommen offensichtlich durch die Substitution an C-3 zustande. Im HMBC-Spektrum von **88** ist die Kopplung von C-3 mit H-1' zu sehen (siehe Abbildung 6-23).

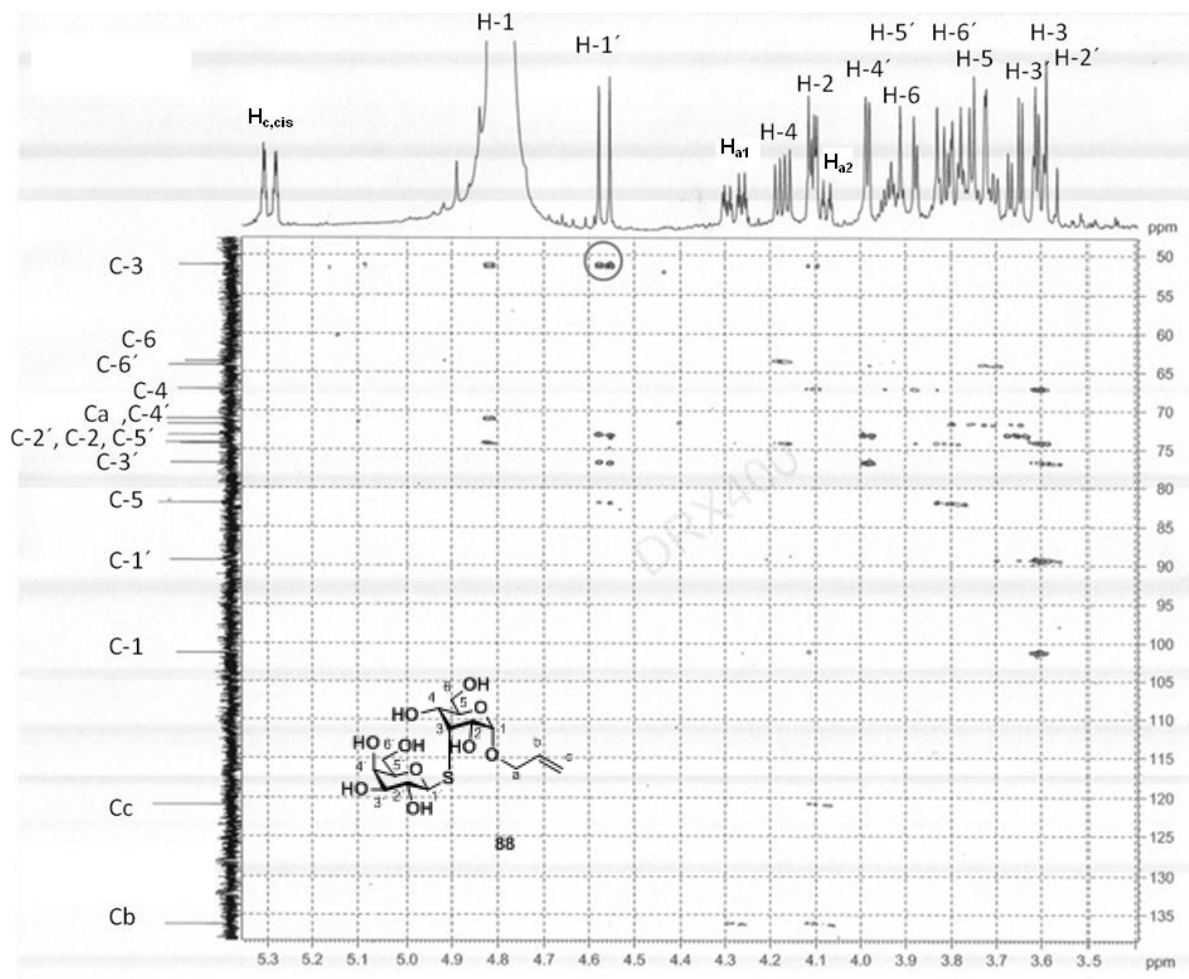


Abbildung 6-23: HMBC-Spektrum von Verbindung **88** (D₂O).

Dies zeigt an, dass die Glukose durch eine S_N2-Reaktion in Allose umgewandelt wurde und Galaktose α -1,3 an diese Allose gebunden ist. Im ¹³C-NMR-Spektrum resoniert C-1' für **87**, **88** und **90** bei $\delta = 88.80$, 89.31 und 88.87 . Die Protonen H-1' resonieren im ¹H-NMR-Spektrum als Dubletts bei $\delta = 4.62$, 4.56 bzw. 4.49 mit aufgrund der Thioverknüpfung erhöhten Kopplungskonstanten von $J = 9.9$, 9.6 bzw. 9.9 Hz, was auf eine β -thioglykosidische Bindung schließen lässt. Das Proton H-1'' von Verbindung **91** resoniert als Dublett bei $\delta =$

4.67 mit einer Kopplungskonstante von $J = 7.8$ Hz, was für die β -thioglykosidische Bindung der Laktose charakteristisch ist (siehe Abbildung 6-24).

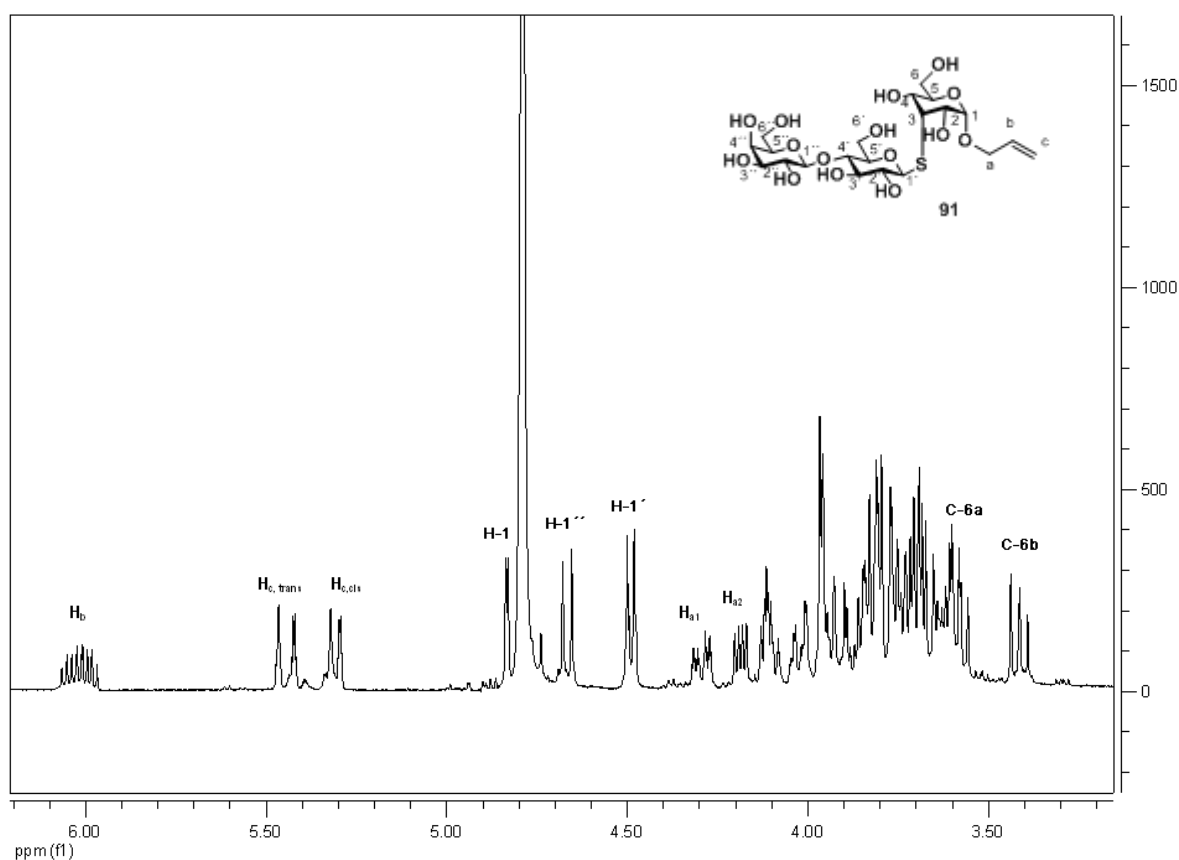


Abbildung 6-24: ^1H -NMR von Verbindung **91** (400 MHz, D_2O).

Bei Verbindung **87** resoniert C-3 im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 51.11$, C-6 und C-6' bei $\delta = 63.56$ bzw. 63.68 . Bei Verbindung **88** resoniert C-3 bei $\delta = 51.25$ und C-6 und C-6' bei $\delta = 63.54$ bzw. 64.04 . Bei Verbindung **90** resoniert C-3 bei $\delta = 53.11$ und C-6 und C-6' bei $\delta = 63.25$ bzw. 63.58 . Die Hochfeldverschiebung für C-3 bei allen Verbindungen kommt durch die thioglykosidische Verknüpfung dieses Kohlenstoffatoms zustande. Bei Verbindung **90** liegt das Signal von C-1' bei $\delta = 89.31$. H-1' resoniert im ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 5.41$ als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 1.4$ Hz, was auf eine α -thioglykosidische Bindung hinweist. Die geringe Kopplungskonstante kommt durch die axiale 2'-Hydroxylgruppe der Mannose zustande. Die Allylgruppe zeigt bei allen vier Verbindungen die charakteristischen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum. Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **87** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 6.00$, 5.43 , 5.29 , 4.28 und 4.17 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -

NMR-Spektrum bei $\delta = 136.23, 120.77$ und 70.96 . Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **88** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.99, 5.42, 5.29, 4.27$ und $4.12\text{--}4.08$. Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.21, 120.87$ und 71.01 . Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **90** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 6.00, 5.41, 5.30, 4.31$ und 4.14 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.27, 121.10$ und 71.76 . Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **91** resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 6.02, 5.44, 5.31, 4.29$ und $4.15\text{--}4.07$.

6.3 Potential der chemoenzymatischen Synthese

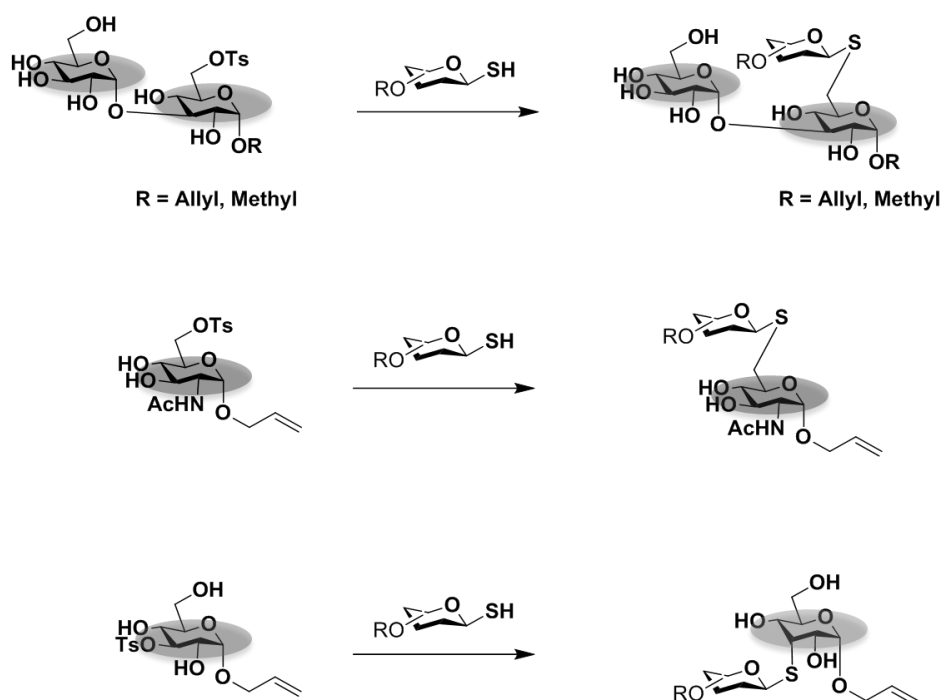


Abbildung 6-25: Chemische Substitution erzeugt diverse verzweigte Thiooligosaccharide.

Thioglykoside werden von den meisten biologischen Systemen toleriert, sind aber im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden O-Glykosiden weniger anfällig für Säure/Base- oder Enzym-vermittelte Hydrolyse.^[154] Dies bietet einerseits die Möglichkeit, mechanistische Studien mit den Thioanaloga der natürlich vorkommenden Zucker durchzuführen, um so die Mechanismen von Enzymen, insbesondere Glykosidasen, aufzuklären. Darüber hinaus könnten diese Analoga als effektive Therapeutika eingesetzt werden, da sie aufgrund ihrer

längeren Halbwertszeit länger im Körper stabil vorliegen. Thioverknüpfte Tumervakzine könnten so effizient die Bildung einer größeren Anzahl spezifischer Antikörper gegen die entsprechenden Tumorzellen bewirken, so dass ihr Einsatz vielversprechender als mit den herkömmlichen O-Glykosiden ist. Darüberhinaus ist wahrscheinlich, dass man mit einer geringeren Menge an Vakzin auskommt. Die Allylgruppe eröffnet Wege zu einer Vielzahl spezifischer wasserkompatibler Reaktionen. Sie kann in ein Aldehyd oder ein vielseitiges Amin^[155] durch Ozonolyse oder photochemische Addition von Cysteamin umgewandelt werden. Als Aldehyd bietet sich die Möglichkeit, das Kohlenhydrat mit Aglykonen wie Peptiden, Natur- und Wirkstoffen oder Festphasen wie Mikrotiterplatten durch z.B. reduktive Aminierung ohne Einführung von Schutzgruppen zu verknüpfen^[156, 157], um z.B. Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zu untersuchen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte chemoenzymatische Synthese bietet die Möglichkeit, Thiooligosaccharide in großer Diversität zweistufig aufzubauen. Hierbei kann Glukose α -O-glykosidisch wahlweise an Position 3 (unter Verwendung der Glykosyltransferase R), an Position 2 (unter Verwendung der Glykosyltransferase R und Übertragung auf Laktose) oder an Position 4 (unter Verwendung der Glykosyltransferase A) gebunden werden. Desweiteren konnten diverse Kohlenhydrate auf Position 6 von Glukose und N-Acetylglukosamin oder auf Position 3 von in Allose umgewandelter Glukose übertragen werden. Die Thiooligosaccharide setzen sich aus nahezu allen relevanten Monosacchariden zusammen wie Glukose, Galaktose, Mannose, N-Acetylglukosamin, Fucose und N-Acetylneuraminsäure. Zusätzlich konnte Allose als ein relativ selten in natürlichen Oligosacchariden vorkommendes Monosaccharid übertragen werden. Die Allose könnte aufgrund der ungewöhnlichen axialen Stellung der Hydroxylgruppe an C-3 zu neuartigen Wechselwirkungen der Thiooligosaccharide mit Proteinen führen. Die chemoenzymatische Synthese bietet die Möglichkeit, zwischen α - und β -, thio- und O-glykosidischer Verknüpfung und der Übertragung einer Vielzahl von Monosacchariden auf verschiedene Akzeptoren zu wählen. In Zukunft soll die chemoenzymatische Synthese noch erweitert werden: Das an C-2 tosylierte Glukosederivat sollte durch Substitution mit 1-Thiozuckern in Mannose umgewandelt werden können, so dass die Diversität noch gesteigert werden kann. Außerdem soll untersucht werden, ob in Position 1 allyliertes N-Acetylglukosamin, 2-Tosylglukose und 3-Tosylglukose mit der GTFR und der GTFA Akzeptorprodukte bilden und welche Verknüpfung diese aufweisen. Untersuchungen zeigten,

dass Mutanten der GTFR Allose anstelle von Glukose übertragen könnten. Hier soll nach weiteren Mutanten gescreent werden, welche weitere Monosaccharide wie Galaktose, Mannose oder Fucose übertragen können.

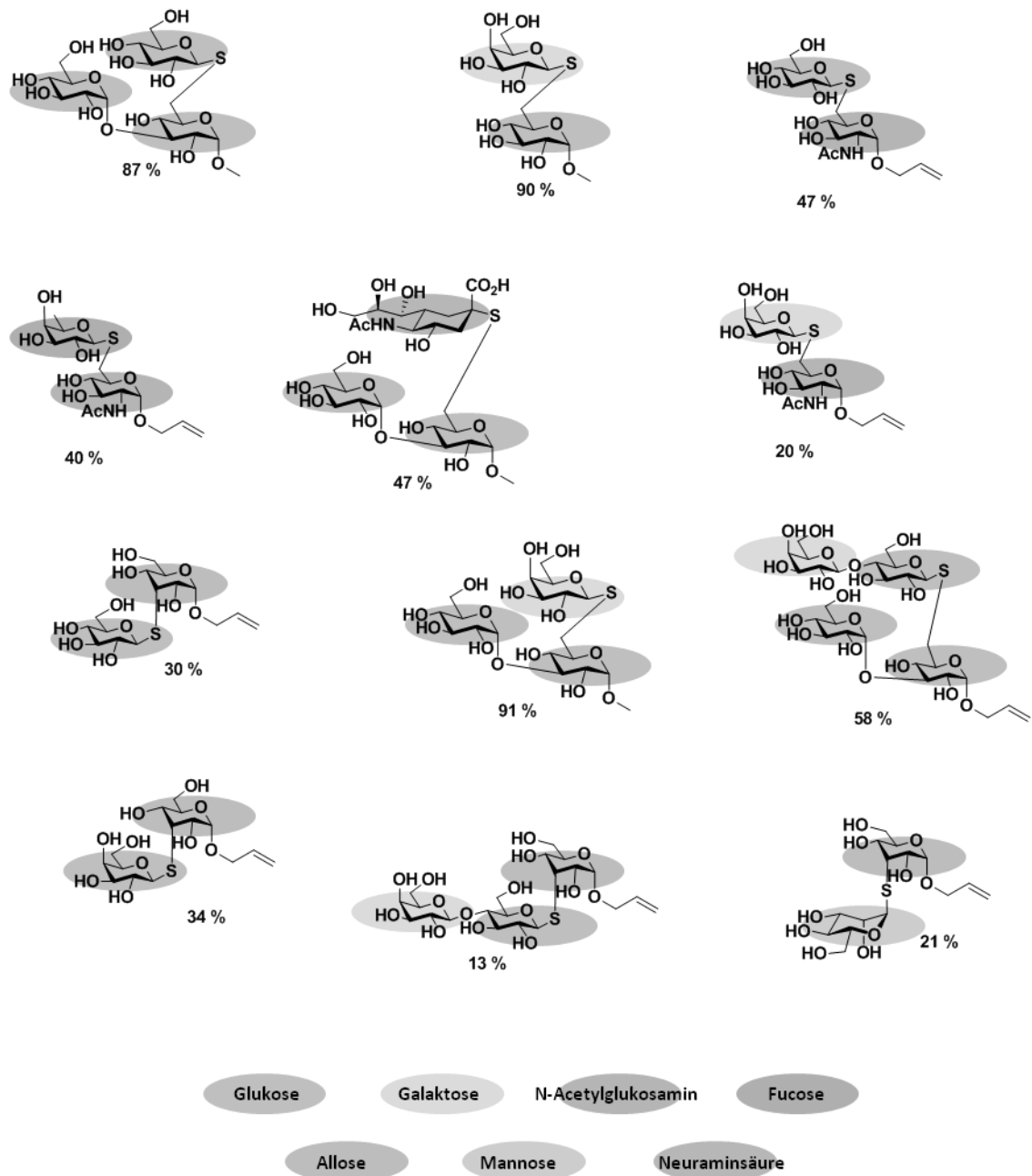


Abbildung 6-26: Diversität der ein- bis zweistufig synthetisierten Oligosaccharide.

In bisherigen Synthesen werden meist nur diejenigen Strukturen synthetisiert, welche bei biologischen Prozessen von Bedeutung sind. Während Nukleinsäuren und Peptide in beliebigen Sequenzen durch Syntheseautomaten synthetisiert werden können, erfordert die Synthese von Oligosacchariden ausgeklügelte Synthesestrategien, welche sich nur selten auf die Synthese anderer Oligosaccharide übertragen lassen. Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode kann eine enorme Vielzahl verschiedener Oligosaccharide synthetisiert werden und zwar sowohl natürlich vorkommende als auch unnatürliche Oligosaccharide. Dies bietet die Möglichkeit, Untersuchungen anzuschließen, welche Strukturelemente bei Oligosacchariden von Bedeutung für biologische Erkennungsprozesse sind. Es sind bereits einige Beispiele bekannt, bei denen relativ einfache Strukturen Erkennungsprozesse einleiten, wie beispielsweise das T- und Tn-Antigen. Mithilfe von Mikroarrays sollte nun untersucht werden, ob die synthetisierten Thiooligosaccharide biologisch relevante Proteine binden. Sollte dies der Fall sein, wäre durch die entwickelte chemoenzymatische Synthese ein direkter Zugang zu potentiellen Kandidaten für kohlenhydratbasierte Impfstoffe oder Inhibitoren geschaffen worden.

7 Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen auf Mikroarrays

Für die Untersuchung der Rolle von Nukleinsäuren und Proteinen in biologischen Systemen existieren bereits zahlreiche Methoden. So ist die automatisierte Synthese dieser Biomoleküle seit Jahren etabliert; hinzu kommen die schnelle Sequenzierung, die Untersuchung der Genexpression durch cDNA Mikroarrays, Gen-Silencing mithilfe von siRNA und viele weitere Techniken. In der Glykomik jedoch fehlen bis heute äquivalente Techniken, welche Auskunft über die Rolle der Kohlenhydrate in biologischen Systemen geben können.

In letzter Zeit ist die Entwicklung von Kohlenhydratarrays ins Interesse der Forschung gerückt. Durch Anbindung der Zucker auf einen festen Träger können Zelloberflächen *in vitro* imitiert werden, auf denen Erkennung, Adhäsion und interzelluläre Signalvermittlung durch die auf ihrer Oberfläche präsentierten Kohlenhydrate stattfinden. Eine genaue Kenntnis der Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen würde Auskunft über die Mechanismen der interzellulären Signalübermittlung geben und so die Möglichkeit bieten, neue diagnostische und therapeutische Methoden zu finden. Die Untersuchung der Wechselwirkungen *in vivo* ist aufgrund der Vielzahl der dort präsentierten Kohlenhydrate kaum möglich. Auf festen Trägern jedoch können relevante Kohlenhydrate nach ihrer Wechselwirkung mit Proteinen, wie z.B. bakteriellen und viralen Toxinen, Antikörpern oder ganzen Zellen untersucht werden. Ein weiterer Vorteil dieses Screenings sind die geringen Mengen an benötigter Substanz, so dass der umweltbelastende Faktor minimiert wird. Wir entschieden uns für die Untersuchung der Wechselwirkung der von uns synthetisierten Kohlenhydrate mit Lektinen. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zell-Zell-Erkennung, virale und bakterielle Pathogenese und Entzündungen.^[158] Sie werden u.a. zur Erforschung der Aktivität von Glykosidasen und Glykosyltransferasen, zur Charakterisierung der Zelloberflächenpräsentation von Glykanen und damit verbundenen Krankheitsbildern als auch als Zellmarker in der Diagnose von Infektionen eingesetzt.^[159] So befindet sich beispielsweise ein Mistel-Lektin in klinischen Studien als Wirkstoff gegen Krebs.^[160] Die Untersuchung der Bindung von Lektinen an Zellen, Gewebe und Glykoproteine wird durch komplexe Mischungen von Kohlenhydratepitopen erschwert. Techniken wie Glykoaffinitäts-

Chromatographie, Oberflächenplasmonresonanz und isotherme Kalorimetrie und Inhibitionsstudien erfordern aufgereinigte und einheitliche Kohlenhydrate. Diese Techniken benötigen große Mengen an Kohlenhydraten und sind nicht im Hochdurchsatzverfahren durchführbar.^[161, 162]

7.1 Untersuchung auf Mikrotiterplatten

Zunächst sollten Kohlenhydrate auf 96-well Mikrotiterplatten, deren Oberfläche mit Aminogruppen funktionalisiert ist, immobilisiert werden. Die chemoenzymatisch synthetisierten Thiooligosaccharide sollten in wenigen Schritten und umweltschonend auf die Oberfläche kovalent gebunden werden können, um in einem Folgeschritt die Wechselwirkung der Kohlenhydrate mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Lektinen zu bestimmen. (Abbildung 7-1).

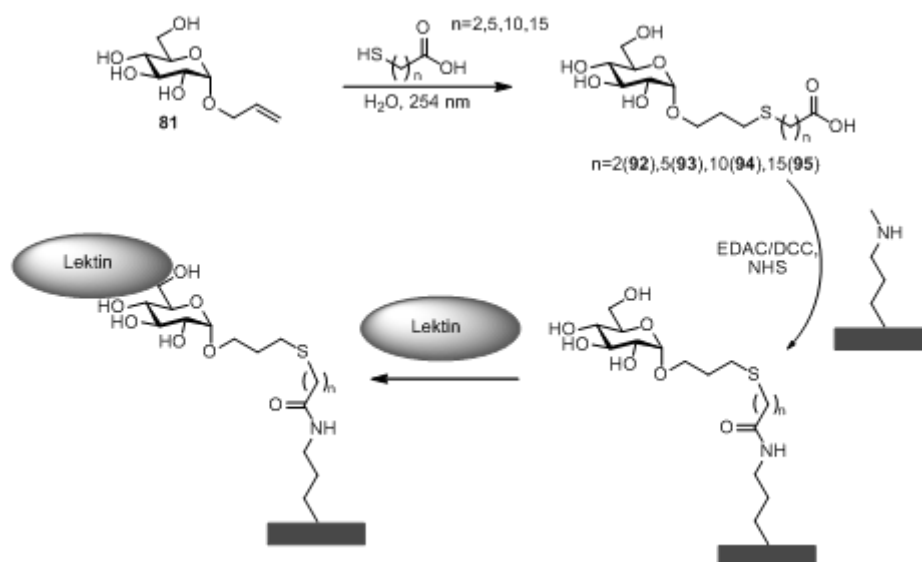


Abbildung 7-1: Photochemische Synthese säurefunktionalisierter Glukosederivate und deren Anbindung an Mikroarrays. (EDAC = 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, NHS = *N*-Hydroxysuccimid)

Der Schlüsselschritt ist der photochemisch induzierte Angriff einer Thiolgruppe an die Allylgruppe des Oligosaccharids. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur und in Wasser durchgeführt. Da die Mikrotiterplatten nicht UV-stabil waren, war es nicht möglich, diese zunächst mit 3-Mercaptopropionsäure (3-MPA) zu funktionalisieren und anschließend unter UV-Bestrahlung mit den allylfunktionalisierten Kohlenhydraten umzusetzen. Also wurde

zunächst Allyl-Glukose mit 3-MPA umgesetzt und das säurefunktionalisierte Glukosederivat **92** erhalten. Dieses konnte durch Aktivierung mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid (EDAC/NHS) an die aminofunktionalisierte Oberfläche unter Bildung eines Amids gebunden werden. Anschließend wurde die Wechselwirkung durch Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Concanavalin A (ConA) untersucht, welches Glukose und Mannose spezifisch bindet. Es war eindeutig eine Bindung zu erkennen (rote Felder, Abbildung 7-2), was die Negativkontrolle (E1, E2, F1, F2), wo kein Zucker, aber dennoch Lektin aufgetragen wurde, bestätigt. In den Reihen C und D wurde zwar Zucker aufgetragen, aber kein Lektin zugegeben. In den Reihen G und H wurden weder Zucker noch Lektin zugegeben.

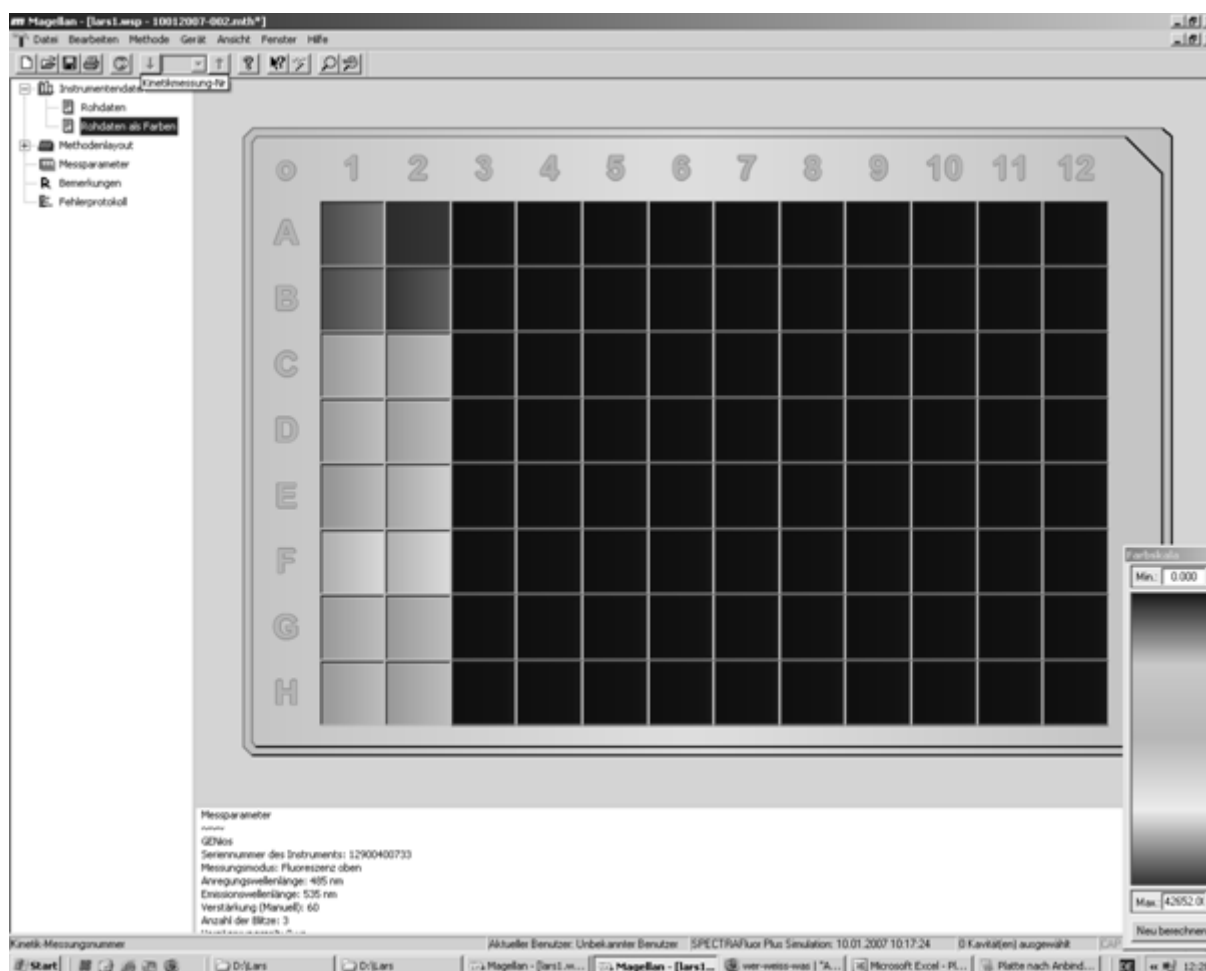


Abbildung 7-2: Fluoreszenz-Scan der Mikrotiterplatte. Es wurde der Scanner Sunrise der Firma *Tecan* verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Extinktion von 535 nm und einer Anregung bei 485 nm. Die Auswertung erfolgte mit der Software Magellan von *Tecan*.

7.2 Untersuchung auf Mikroarrays

Die erfolgreichen Vorversuche auf der Mikrotiterplatte sollten nun auf Mikroarrays übertragen werden. Mikroarrays sind kleine Glasplatten in Größe von Mikroskopie-Objektträgern, auf denen Biomoleküle gebunden werden. Während DNA- und Protein-Mikroarrays schon seit geraumer Zeit etabliert sind, steht die Forschung bei den Kohlenhydrat-Mikroarrays noch am Anfang. Das Chip-Format bietet zahlreiche Vorteile gegenüber konventionellen Methoden. Die Kohlenhydrate haben eine definierte Ausrichtung auf der Oberfläche des Chips, wodurch die Vorgänge an Zelloberflächen imitiert werden. Hinzu kommt, dass durch Multivalenz-Effekte die niedrige Bindungsaffinität zwischen Proteinen und Kohlenhydraten überwunden wird. Es können theoretisch mehrere Tausend Verbindungen parallel untersucht werden und es werden nur minimale Mengen an Kohlenhydrat und Protein benötigt, welche in den meisten Fällen durch komplexe Synthesen in nur geringen Mengen zugänglich sind. Es sind zahlreiche Methoden bekannt, die Kohlenhydrate auf einer funktionalisierten Glasoberfläche anzubringen, wie z.B. Nitrocellulose-beschichtete Chips für eine nicht-kovalente Immobilisierung von mikrobiellen Polysacchariden und neoglykolipid-modifizierten Oligosacchariden^[108], Polystyrol-Mikrotiterplatten zur Anbringung von Glykolipiden^[113], durch Diels-Alder-vermittelte Kupplung von Cyclopentadien-derivatisierten Sacchariden selbst-organisierte Monoschichten^[163], Thiol-derivatisierte Chips mit Maleimid-funktionalisierten Kohlenhydraten^[111].

7.2.1 Anbindung säurefunktionalisierter Glykane auf Glaschips

Es sollte nun die bereits bei den Mikrotiterplatten erfolgreich durchgeführte Methode verwendet werden. Die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten ließ es nicht zu, diese zuerst mit 3-Mercaptopropionsäure zu funktionalisieren und anschließend die Allylzucker unter UV-Bestrahlung anzubinden. Ob die Oberfläche der Glasslides ebenfalls UV-empfindlich ist, war nicht bekannt. So wurde in den Versuchen a)-c) probiert, zuerst 3-MPA an die aminofunktionalisierte Oberfläche verschiedener Glasslides zu binden, um somit thiofunktionalisierte Glasslides zu erhalten, an welche die Allylzucker unter UV-Bestrahlung

gebunden werden sollten. Anschließend wurde Allylglukose unter UV-Bestrahlung zugegeben. Danach wurden die freien Thiol-Gruppen, welche nicht mit 3-MPA reagiert hatten, unter Zugabe von *N*-Ethylmaleimid blockiert. Durch Zugabe von Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) sollte eine unspezifische Bindung der Lektine unterbunden werden. Hierbei war darauf zu achten, dass nicht glykosyliertes BSA verwendet wurde.

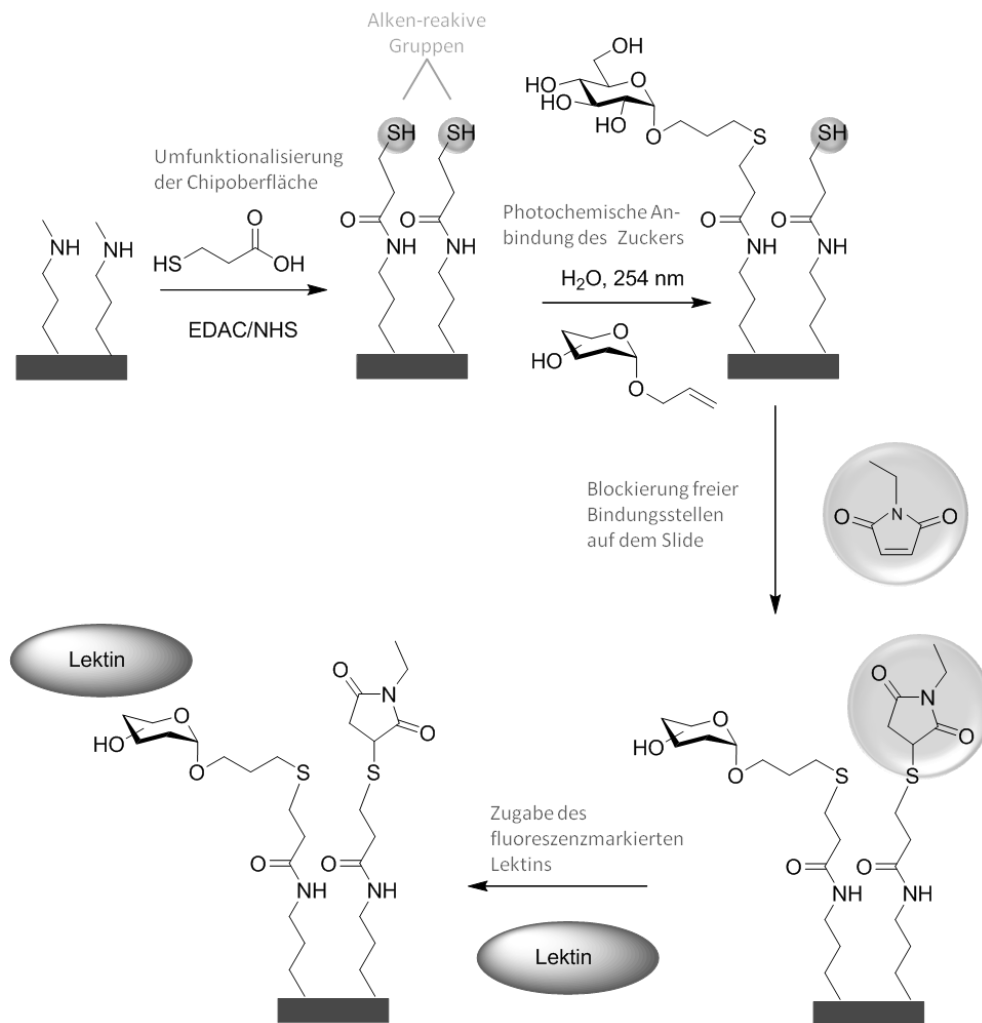


Abbildung 7-3: Konzept für die Versuche a) bis c).

Nach der Zugabe von fluoreszenzmarkiertem ConA konnte jedoch beim Scannen der Slides keine Bindung festgestellt werden. Um sicher zu gehen, dass die Oberfläche der Slides nicht durch die UV-Strahlung beschädigt wurde, wurden die Allylzucker bei Versuch d) zuerst säurefunktionalisiert und erst dann auf den Chip unter EDAC/NHS-Aktivierung gebunden. Jedoch konnte auch hierbei keine Bindung des Lektins festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob der Abstand der Zucker von der Oberfläche des Slides zu gering ist, damit die Lektine die

Chemical reaction scheme showing the synthesis of a fluorophore-labeled protein on a solid support. The reaction involves a resin-bound amine (NH-CH₂CH₂CH₂-) reacting with a fluorophore-protected amino acid derivative (96) in the presence of Na₂CO₃-Puffer, DMF, and Glycerol. The product is a resin-bound fluorophore-labeled protein (NH-CH₂CH₂CH₂-).

In Versuch g) wurde ein Epoxid-funktionalisierter Slide verwendet. Hierbei wurde Glukosamin verwendet. Die freien Bindungsstellen mit Ethanolamin blockiert, BSA und anschließend ConA zugegeben, wobei jedoch keine Bindung nachgewiesen werden konnte. Um herauszufinden, ob in den bisherigen Versuchen die Anbindung der Zucker oder die Anbindung des Lektins nicht funktionierte, wurde in Versuch h) ein Fluoreszenzfarbstoff über EDAC/NHS-Aktivierung (also analog zu den Versuchen d) und f)) direkt auf das Slide

gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff an das Slide gebunden hatte (Abbildung 7-5). Somit konnte nachgewiesen werden, dass nicht die Anbindung der Zucker, sondern vielmehr deren Nachweis durch das Lektin problematisch gewesen war. Die Ursachen hierfür können in einem zu geringen Abstand der Zucker von der Oberfläche des Slides liegen, so dass die Zucker für die Lektine nicht genügend zugänglich sind. Ebenso kann es sein, dass die Dichte der gebundenen Zucker nicht ausreichend war, um Multivalenz-Effekte hervorzurufen, welche für die Bindung des Lektins notwendig sind. Da jedoch in Versuch h) zur Anbindung des Farbstoffes ein basischer Puffer verwendet wurde, sollte ein Kontrollversuch zeigen, dass nicht etwa der pH-Wert des Puffers die Ursache der negativen Ergebnisse der bisherigen Versuche war.

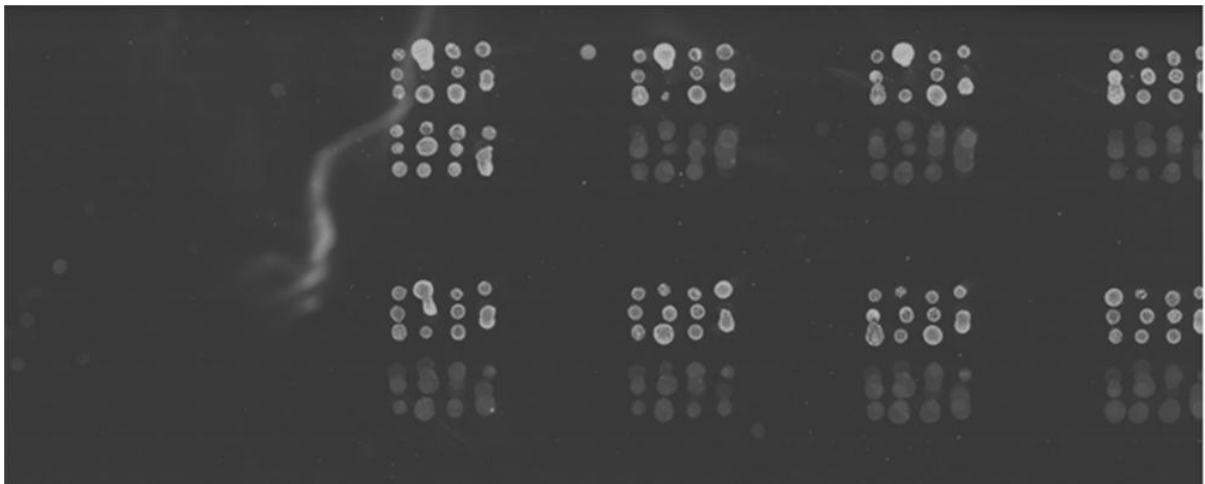


Abbildung 7-5: Versuch h): Nachweis der direkten Anbindung des Farbstoffs **96** auf das Slide.

In Versuch i) wurde säurefunktionalisierte Glukose unter EDAC/NHS-Aktivierung mit basischem Puffer verwendet. Hierbei ließ sich jedoch nach Zugabe des Lektins keine Bindung nachweisen. In Versuch j) wurde ein aminofunktionalisierter Slide eines anderen Herstellers verwendet. Es wurden vier Glukosederivate mit unterschiedlichen Linkerlängen verwendet. Die freien Bindungsstellen wurden jedoch nicht blockiert, sondern lediglich BSA und anschließend ConA zugegeben. Folglich war beim Scannen ein starkes Hintergrundsignal aufgrund der unspezifischen Bindung des Lektins an die Oberfläche des Slides zu sehen. An den Stellen jedoch, wo zuvor der Zucker gespottet wurde, war das Signal deutlich schwächer und in Form von dunklen Punkten auf hellem Hintergrund zu sehen (Abbildung 7-6). Daraus ließ sich folgern, dass der gespottete Zucker vom Lektin viel schwächer als die freien Aminogruppen auf dem Slide gebunden wurde. Aufgrund der schwachen Bindung, welche

vermutlich durch eine zu schlechte Zugänglichkeit der Zucker zustande kam, war in den vorherigen Versuchen vermutlich das Signal zu schwach, um detektiert zu werden. Versuch k) wurde analog zu Versuch j) durchgeführt, nur dass die freien Bindungsstellen vor Zugabe des Lektins durch kovalente Bindung von Bernsteinsäureanhydrid blockiert wurden. Es wurden zwei Lektine (ConA und als Negativkontrolle UEA-I, welches spezifisch für L-Fukose ist) zugegeben. Jedoch konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Folglich schien die Bindung des Lektins zu schwach zu sein, um detektiert zu werden.

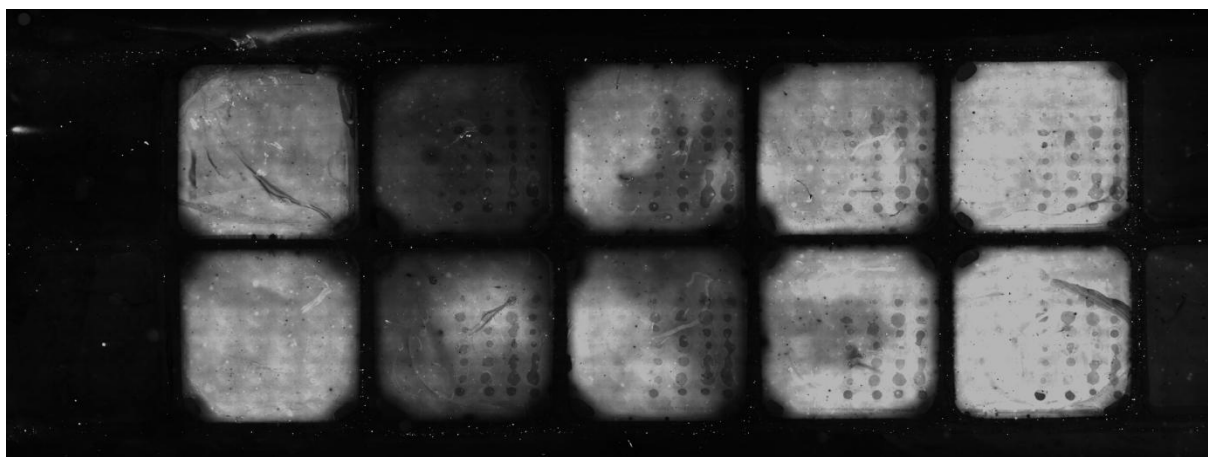


Abbildung 7-6: Versuch j): FITC-ConA bindet unspezifisch an den Chip außer dort, wo die Kohlenhydrate gespottet wurden.

7.2.2 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen **92**, **93**, **94** und **95**

Der Strukturbeweis der Verbindungen **92**, **93**, **94** und **95** gelang mithilfe der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie. Das anomere Proton H-1 resoniert für **92**, **93**, **94** und **95** im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 4.79$, 4.92 , 4.86 und 4.86 mit entsprechenden Kopplungskonstanten von $J = 3.8$, 3.7 , 3.8 und 3.8 Hz, was charakteristisch für die α -Verknüpfung an C-1 ist. Die Signale der anomeren Kohlenstoffatome liegen im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 101.00$, 100.15 , 99.18 und 99.18 . Das Signal von COOH lässt sich bei $\delta = 179.53$, 175.95 , 177.64 bzw. 177.61 erkennen. Für Verbindung **92** resonieren die eingeführten CH_2 -Gruppen im ^1H - bei $\delta = 2.87$ - 1.85 und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 37.02$ - 28.99 . Für Verbindung **93** resonieren die eingeführten CH_2 -Gruppen im ^1H - bei $\delta = 2.65$ - 1.36 (siehe Abbildung 7-7) und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 34.69$ - 25.61 (siehe Abbildung 7-8). Für Verbindung **94** resonieren die eingeführten CH_2 -Gruppen im ^1H - bei $\delta = 2.98$ - 1.54 und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 34.96$ - 26.03 . Für Verbindung **95** resonieren die

eingeführten CH₂-Gruppen im ¹H- bei $\delta = 2.29$ - 1.25 und im ¹³C-NMR-Spektrum bei $\delta = 35.53$ - 26.62 . Das ESI-Massenspektrum der Verbindungen **92**, **93**, **94** und **95** zeigt bei $m/z = 349$, 367 , 433 bzw. 507 einen Basispeak, der dem jeweiligen Konjugat [M+Na]⁺, [M-H]⁻, [M-5H]⁵⁻ bzw. [M-H]⁻ entspricht.

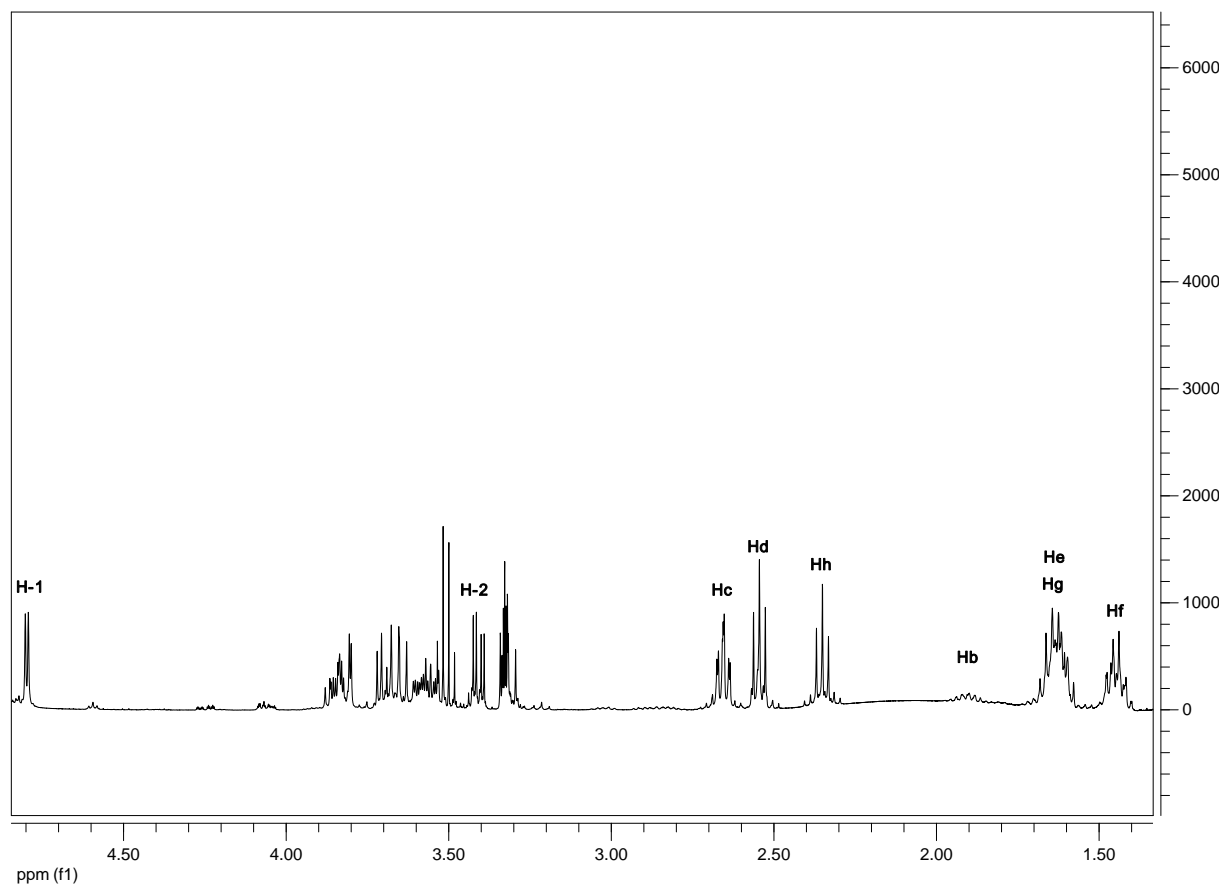


Abbildung 7-7: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **93** (400 MHz, CD₃OD).

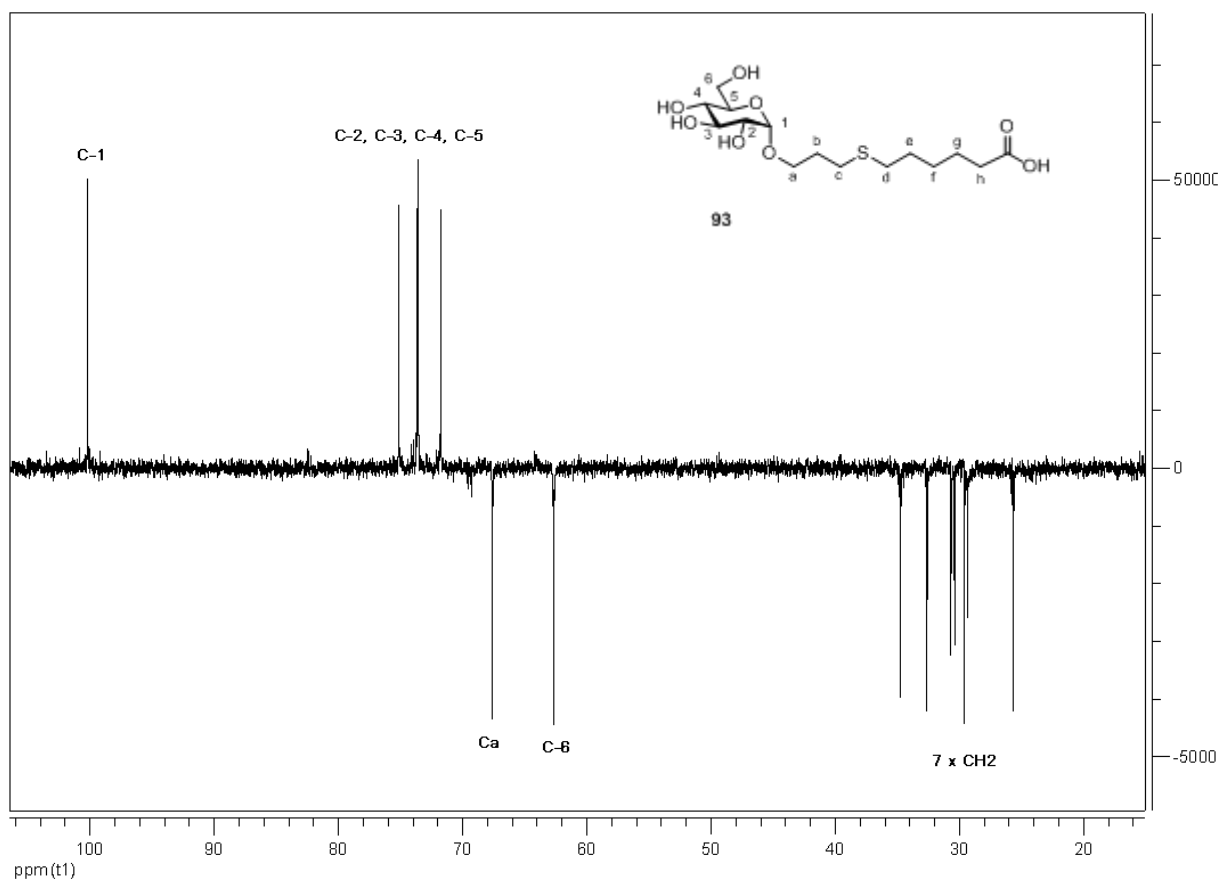


Abbildung 7-8: ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum von Verbindung **93** (100 MHz, CD_3OD).

7.2.3 Anbindung aminofunktionalisierter Glykane auf Glaschips

Aus den vorherigen Versuchen ließ sich schlussfolgern, dass die Kohlenhydrate zwar auf die Chips gebunden werden konnten, der darauffolgende Nachweis mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin jedoch nicht möglich war. Problematisch war scheinbar der zu geringe Abstand der gebundenen Glykane von der Oberfläche des Chips, so dass die voluminösen Lektine die Glykane nicht binden konnten. Von der Firma Schott wurden Slides angeboten, welche eine spezielle Hydrogeloberfläche haben, welche die 3D-Struktur und damit auch die Stabilität und Funktionalität gebundener Moleküle aufrechterhält.^[164]

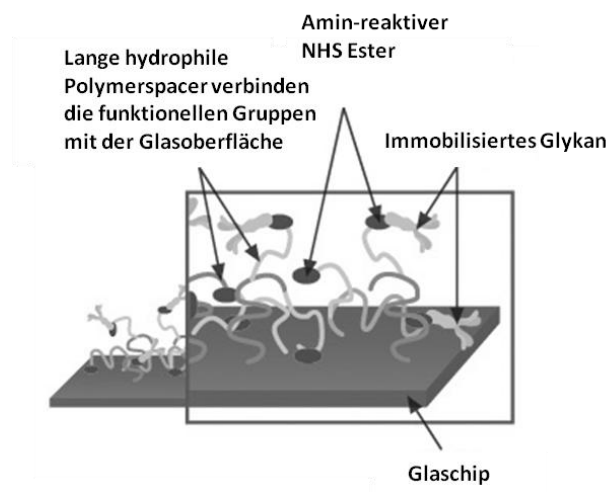


Abbildung 7-9: Slide mit Amin-reaktiver Oberfläche.^[164]

Auf dem Hydrogel sind aktivierte Ester angebracht, so dass aminofunktionalisierte Verbindungen mit diesen reagieren können. Es wurden daher die Allylzucker durch photochemische Umsetzung mit Cysteamin als Amine funktionalisiert. Die Synthese wurde analog zu der Synthese der säurefunktionalisierten Glykane durchgeführt. Die Aufreinigung der Produkte erfolgte über eine Ionentauschersäule, bei der die Aminogruppen der Produkte an das Trägermaterial gebunden wurden und anschließend durch Zugabe von Ammoniaklösung eluiert werden konnten.

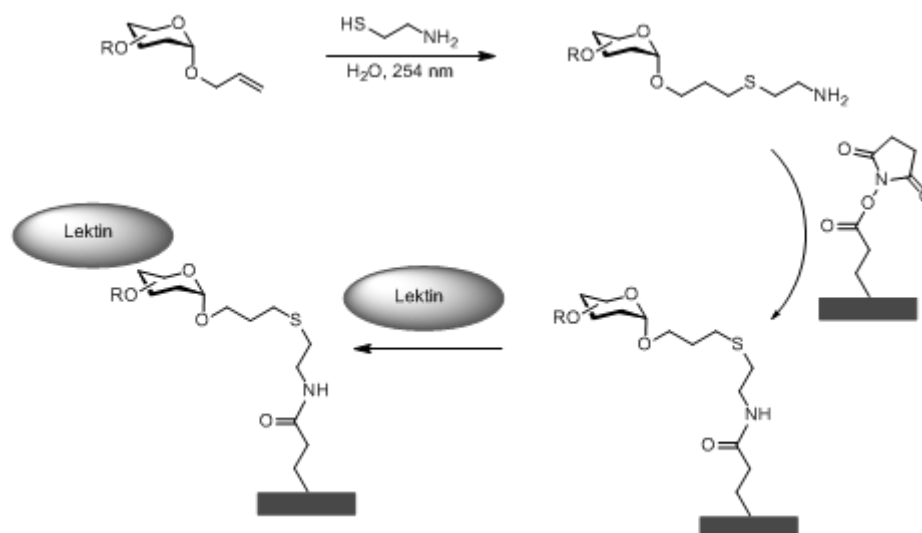
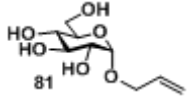
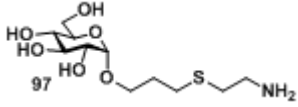
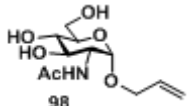
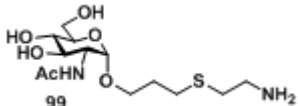
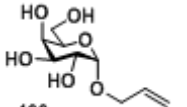
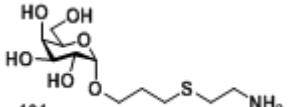
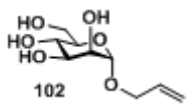
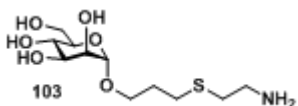
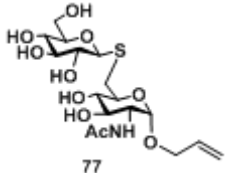
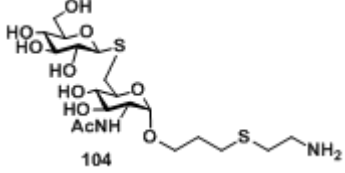
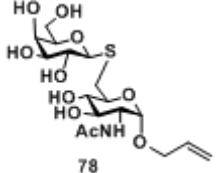
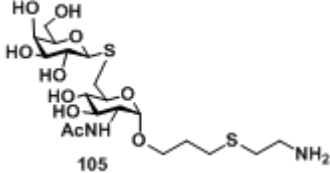
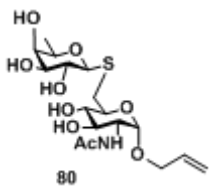
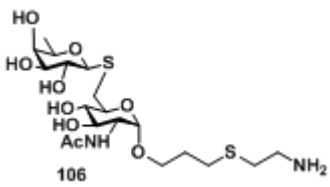
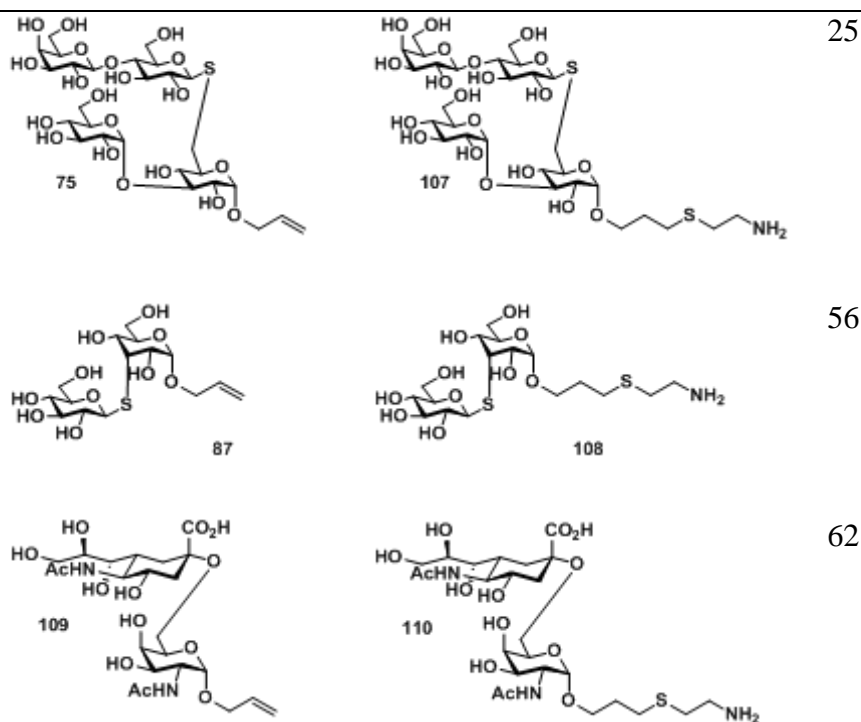


Abbildung 7-10: Photochemische Synthese aminofunktionalisierter Glykane und deren kovalente Anbindung an NHS-aktivierte Glaschips.

Tabelle 7-1: Synthese der aminofunktionalisierten Glykane durch Umsetzung der Allylzucker mit Cysteamin unter UV-Bestrahlung.

Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
		39
		49
		62
		31
		45
		49
		48



In Versuch 1) wurde aminofunktionalisierte Mannose in verschiedenen Konzentrationen auf ein Slide gespottet. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen, bei denen Glycerol zugesetzt wurde, um ein Verdunsten der gespotteten Kohlenhydrate zu vermeiden, wurde nun eine Hybridisierungskammer mit 70% Luftfeuchtigkeit verwendet, die ein zu schnelles Verdunsten der Lösungen verhindern sollte. Nach dem Spotten der Kohlenhydrate wurden die freien Ester auf dem Slide, an welche keine Glykane gebunden hatten, durch Zugabe von Ethanolamin blockiert. Anschließend wurde ConA in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Die Bindung des ConA an die immobilisierte Mannose konnte durch Scannen des Slides gut beobachtet werden. Der Konzentrationsverlauf war ebenfalls sehr gut sichtbar (siehe Abbildung 7-11).

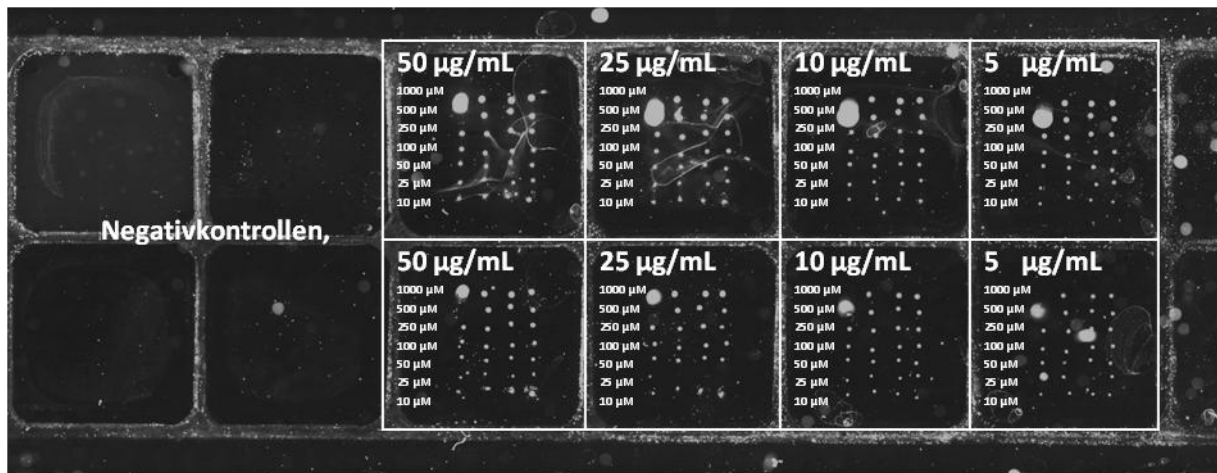


Abbildung 7-11: Nachweis von Mannose durch FITC-ConA mit Konzentrationsverlauf. Bei den Negativkontrollen wurde Lektin zugegeben, aber zuvor kein Zucker angebunden.

In Versuch m) wurden 4 verschiedene aminofunktionalisierte Monosaccharide gespottet. Diese wurden durch Zugabe von 4 fluoreszenzmarkierten Lektinen nachgewiesen. Die Spezifität der Lektine für die unterschiedlichen Monosaccharide wird in Abbildung 7-12 und Abbildung 7-13 sehr gut deutlich. ConA bindet Mannose am stärksten, gefolgt von Glukose und Glukosamin. *Artocarpus integrifolia* Lektin (AIA) und *Griffonia simplicifolia* Lektin I (GS-I) sind Galaktose-bindende Lektine, wie es auch in der Abbildung zu sehen ist. GS-II bindet Glukosamin, was ebenfalls durch den Versuch nachgewiesen werden konnte.

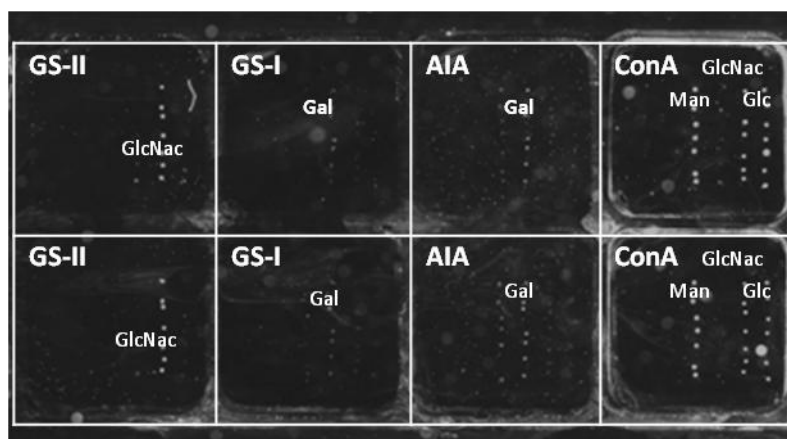


Abbildung 7-12: Spezifischer Nachweis von 4 Monosacchariden (Glukose, N-Acetylglukosamin, Galaktose und Mannose) durch 4 verschiedene Lektine (FITC-ConA, FITC-AIA, FITC-GS-I, FITC-GS-II; AIA = *Artocarpus integrifolia* Lektin, GS = *Griffonia simplicifolia* Lektin).

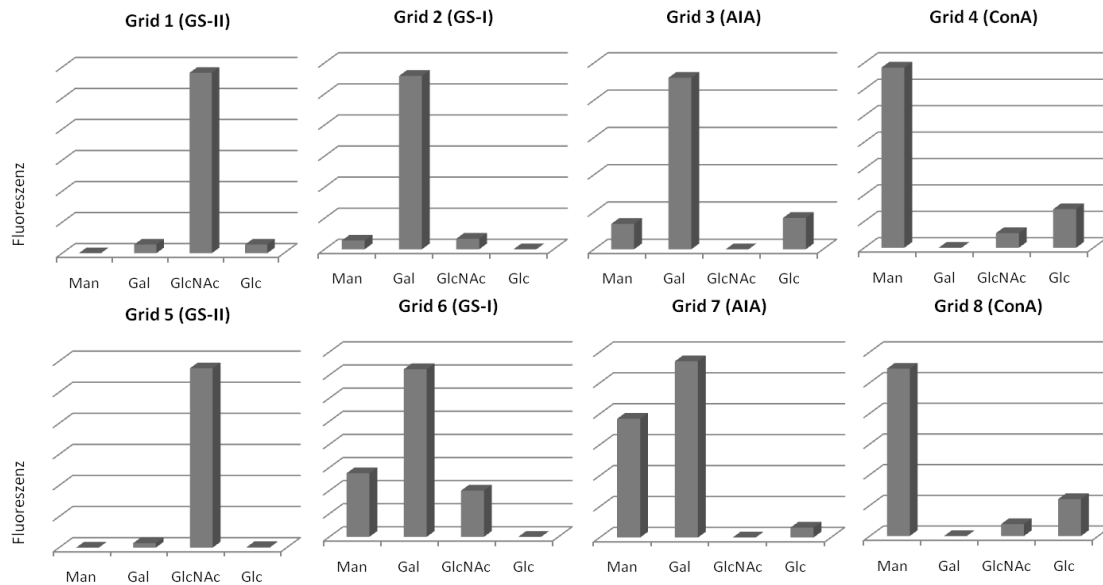


Abbildung 7-13: Stärke des Fluoreszenzsignale, welche durch Scannen der Slides mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* und Auswertung mit der Software *ScanAlyze* erhalten wurde. Es sind deutlich die Spezifitäten von ConA zu Mannose, von AIA und GS-I zu Galaktose und von GS-II zu N-Acetylglukosamin zu erkennen.

Vor kurzem konnte im Arbeitskreis Seibel gezeigt werden, dass mithilfe von Mikroarrays die Substratspezifität und Aktivität von Enzymen bestimmt werden kann. So konnten durch die Verwendung von Glykosyltransferasen auf einer Mikrotiterplatte konnten neue Substratspezifitäten entdeckt werden.^[112] Shi et al. behandelten auf einem Mikroarray gebundene Kohlenhydrate mit β -1,4-Galaktosyltransferase (GalT) und UDP-Galaktose. Anschließend untersuchten sie den Array mit drei Galaktose-bindenden fluoreszenzmarkierten Lektinen. Dabei stellte sich heraus, dass von den 3 verwendeten Lektinen nur RCA₁₂₀ neben Galaktose auch Laktose und N-Acetyllaktosamin erkennen konnte.^[128] In den Versuchen n) bis p) sollte mithilfe der GalT Galaktose auf vier Monosaccharide (Glukose, N-Acetylglukosamin, Galaktose und Mannose) übertragen werden. Es wurden die gleichen Monosaccharide wie in Versuch m) auf den Chip gebunden und anschließend aktivierte UDP-Galaktose sowie GalT zugegeben. Aufgrund der Akzeptorspezifität der GalT sollte die Galaktose auf Glukose und N-Acetylglukosamin übertragen werden. Der Nachweis erfolgte mit ConA, womit in den vorherigen Versuchen erfolgreich Mannose, Glukose und Glukosamin erfolgreich nachgewiesen werden konnten, als auch mit GS-I, womit in den

vorherigen Versuchen erfolgreich Galaktose nachgewiesen werden konnte. In Versuch n) wurden 0.05 U GalT eingesetzt. Es konnte beim Scannen kein Unterschied zwischen den Spots mit und ohne zugegebener GalT festgestellt werden. In Versuch o) wurde deshalb die Enzymkonzentration erhöht und 0.5 U GalT zugegeben. Es konnte ebenfalls keine Übertragung der Galaktose festgestellt werden. In Versuch p) wurden 0.2 U GalT eingesetzt. Beim Scannen konnte man erkennen, dass ConA bei den mit GalT behandelten Spots Glukose nicht mehr erkannte (siehe Abbildung 7-14). Dies ließ darauf schließen, dass hier Galaktose übertragen wurde. Bei GS-I war keine Bindung zu erkennen. Das Lektin bindet zwar Galaktose, wie in Versuch m) gezeigt werden konnte, jedoch scheinbar nicht Laktose und N-Acetyllaktosamin mit der nötigen Affinität.



Abbildung 7-14: Übertragung von Galaktose auf Glukose durch Zugabe von GalT und Nachweis durch den Verlust der Bindungsaffinität von FITC-ConA.

Die Übertragung von Galaktose konnte in Versuch p) nur durch Nichtbinden von ConA an Laktose nachgewiesen werden. GS-I eignete sich nicht als Laktose-bindendes Lektin. Shi et al. identifizierten RCA₁₂₀ als Laktose-bindendes Lektin.^[128] In den Versuchen q) und r) wurde ein Laktose-enthaltendes Oligosaccharid auf den Slide gebunden, um nach weiteren Laktose-

bindenden Lektinen neben RCA₁₂₀ zu screenen. In Versuch q) wurden FITC-markiertes ConA, peanut lectin agglutinin (PNA), *Erythrina cristagalli* Lektin (ECA) und *Bauhinia purpurea* Lektin (BPA) eingesetzt. Keines der Lektine konnte das Laktosederivat erkennen. In Versuch r) wurden FITC-markiertes ConA und soya bean agglutinin (SBA) verwendet. Bei SBA war eine schwache Bindung des Laktosederivats zu erkennen (siehe Abbildung 7-15).

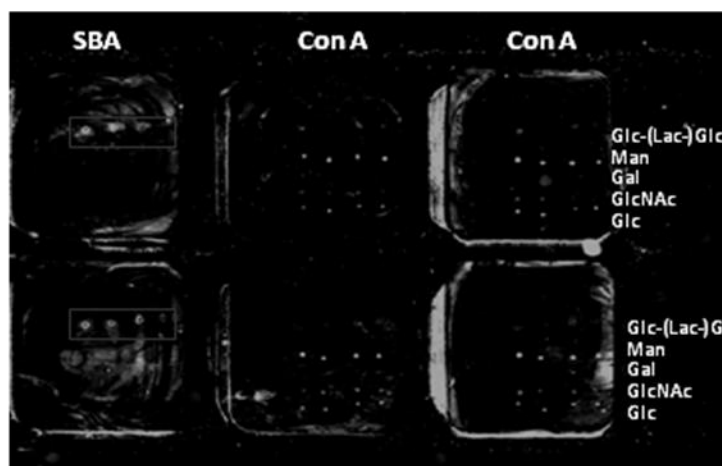


Abbildung 7-15: Nachweis eines Laktose-enthaltenden Tetrasaccharids mit SBA.

7.2.4 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 97, 99, 101, 103, 104, 105, 106, 107, 108 und 110

Die anomeren Protonen H-1 der aminofunktionalisierten Monosaccharide **97**, **99**, **101** und **103** resonieren im ¹H-NMR-Spektrum als Dubletts bei $\delta = 4.91, 4.86, 4.94$ und 4.86 mit für die α -Verknüpfung charakteristischen Kopplungskonstanten von $J = 3.8, 3.6, 3.4$ und 1.6 Hz. Die Signale der anomeren Kohlenstoffatome C-1 liegen im ¹³C-NMR-Spektrum bei $\delta = 100.94, 101.46, 101.14$ und 102.55 . Die Signale der Allylgruppen der Edukte sind weder in den ¹H- noch in den ¹³C-NMR-Spektren zu sehen. Stattdessen resonieren die neu entstandenen CH₂-Gruppen von Verbindung **97** als Triplets bei $\delta = 3.03$ und $\delta = 2.77$ mit einer Kopplungskonstante von jeweils $J = 6.6$ Hz für H_e und H_d, als Dublett von Triplets bei $\delta = 2.69$ mit Kopplungskonstanten von $J = 2.1$ und 7.1 Hz für H_c und als Multiplett bei $\delta = 2.00-1.85$ für H_b. Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome liegen bei $\delta = 41.79$ (C_e), 33.67 (C_d), 31.33 (C_c) und 30.35 (C_b) (siehe Abbildung 7-16). Die neu entstandenen CH₂-Gruppen von Verbindung **99** resonieren als Triplet bei $\delta = 2.94$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 6.6$ Hz für H_e, als Multiplett bei $\delta = 2.71$ für H_d und H_c und als Multiplett bei $\delta = 1.91$

für H_b. Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome lassen sich im ¹³C-NMR-Spektrum bei δ = 43.91 (C_e), 36.73 (C_d), 33.01 (C_c) und 32.20 (C_b) erkennen. Die neu entstandenen CH₂-Gruppen von Verbindung **101** resonieren im ¹H-NMR-Spektrum als Triplets bei δ = 3.06 und δ = 2.79 mit Kopplungskonstanten von jeweils J = 6.6 Hz für H_e und H_d und als Multipletts bei δ = 2.73- 1.63 für H_c und δ = 1.93 für H_b (siehe Abbildung 7-17). Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome lassen sich im ¹³C-NMR-Spektrum bei δ = 41.66 (C_e), 33.15 (C_d), 31.34 (C_c) und 30.34 (C_b) finden. Die neu entstandenen CH₂-Gruppen von Verbindung **103** resonieren im ¹H-NMR-Spektrum als Triplets bei δ = 2.96, 2.74 und 2.67 mit Kopplungskonstanten von J = 6.6 und 6.5 Hz für H_e, H_d und H_c und als Multiplett bei δ = 1.91 für H_b. Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome liegen im ¹³C-NMR-Spektrum bei δ = 41.98 (C_e), 34.55 (C_d), 31.29 (C_c) und 30.37 (C_b). Das ESI-Massenspektrum der Verbindungen **97**, **99**, **101** und **103** zeigt einen Basispeak bei m/z = 320, 361, 320 bzw. 320 für das jeweilige Konjugat [M+Na]⁺.

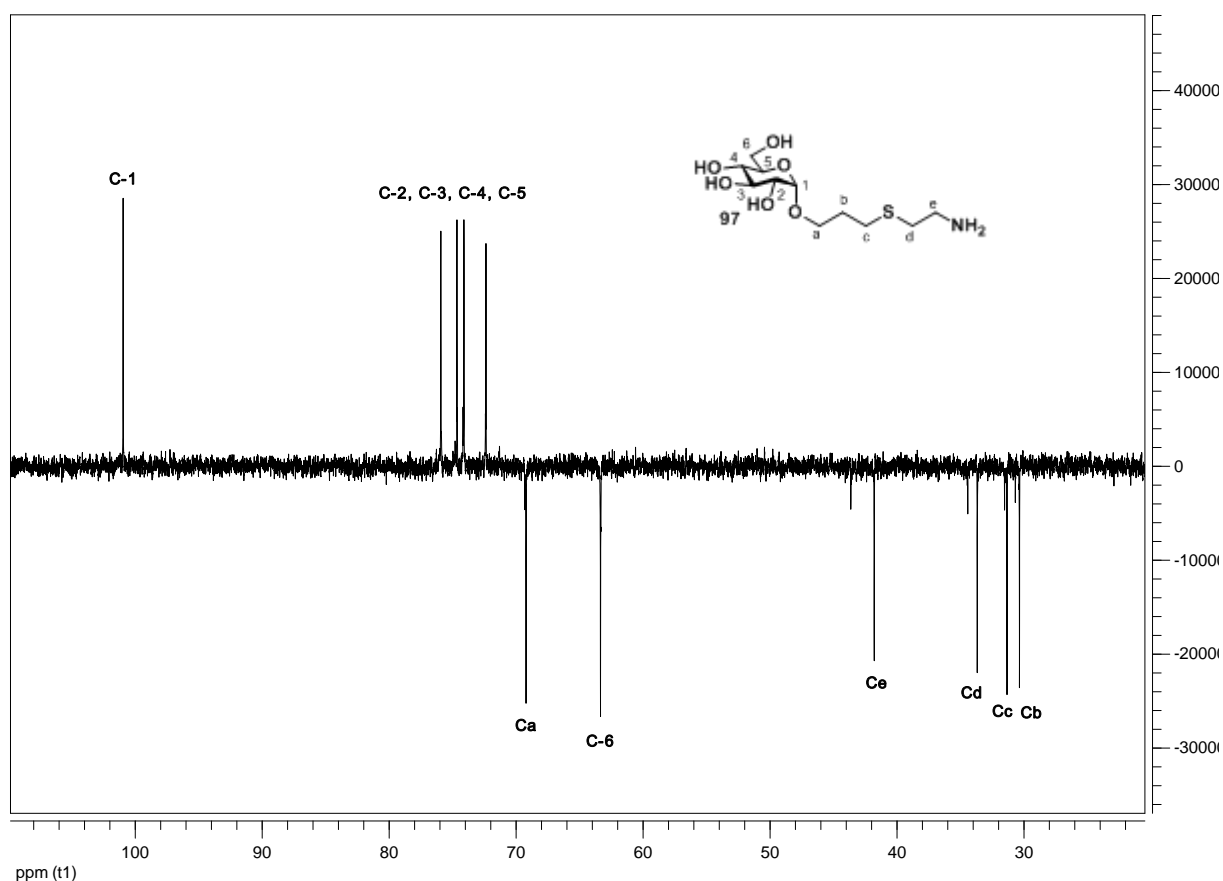


Abbildung 7-16: ¹³C-DEPT-NMR-Spektrum von **97** (100 MHz, D₂O).

Die anomeren Protonen H-1 der aminofunktionalisierten thio-1,6-verknüpften Oligosaccharide **104**, **105**, **106** resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Dubletts bei $\delta = 4.86$, 4.88 und 4.86 mit für die α -Verknüpfung charakteristischen Kopplungskonstanten von $J = 3.8$, 3.9 und 3.7 Hz. Die anomeren Kohlenstoffatome C-1 lassen sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 99.62$, 99.67 bzw. 99.60 finden. Die Signale der Allylgruppe sind weder im ^1H - noch im ^{13}C -NMR-Spektrum zu sehen. Stattdessen resonieren die Signale der hinzugekommenen CH_2 -Gruppen im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **104** als Triplet bei $\delta = 2.96$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 6.5$ Hz für H_e , als Multipllett bei $\delta = 2.76 - 2.67$ für H_d und H_c und als Multipllett bei $\delta = 1.93$ für H_b . Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome liegen im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 40.35$ (C_e), 34.73 (C_d), 31.32 (C_c) und 30.50 (C_b). Die Signale der hinzugekommenen CH_2 -Gruppen von Verbindung **105** resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Multipllett bei $\delta = 2.88$ für H_e und H_d , als Triplet bei $\delta = 2.75$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 6.6$ Hz für H_c und als Multipllett bei $\delta = 1.96$ für H_b . Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome lassen sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 41.30$ (C_e), 34.02 (C_d), 30.63 (C_c) und 30.44 (C_b) erkennen.

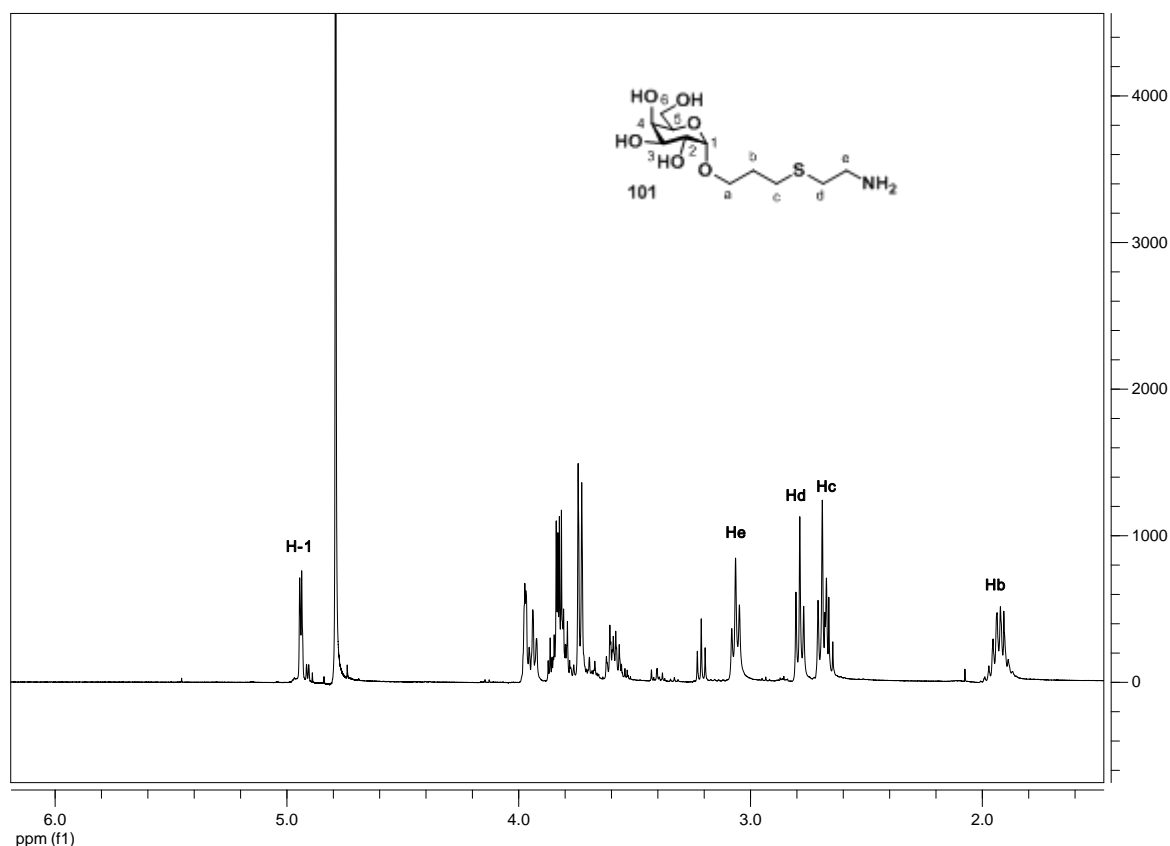


Abbildung 7-17: ^1H -NMR-Spektrum von **101** (400 MHz, D_2O).

Die Signale der hinzugekommenen CH₂-Gruppen von Verbindung **106** resonieren im ¹H-NMR-Spektrum als Triplets bei $\delta = 3.18$ und $\delta = 3.10$ mit Kopplungskonstanten von jeweils $J = 6.5$ Hz für H_e und H_d und als Multipletts bei $\delta = 2.96$ - 2.80 und 1.97 - 1.87 für H_c und H_b. Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome lassen sich im ¹³C-NMR-Spektrum bei $\delta = 41.30$ (C_e), 34.02 (C_d), 30.63 (C_c) und 30.44 (C_b) finden. Das ESI-Massenspektrum der Verbindungen **104**, **105**, **106** und **107** zeigt als Basispeak $m/z = 539$, 539 , 523 bzw. 822 für das jeweilige Konjugat [M+Na]⁺.

Das anomere Proton H-1 von Verbindung **108** ist im ¹H-NMR-Spektrum unter dem H₂O-Signal verdeckt. Das anomere Proton H-1' resoniert bei $\delta = 4.62$ als Dublett mit einer aufgrund der Thioverknüpfung erhöhten Kopplungskonstante von $J = 9.9$ Hz, welche die thioglykosidische β -Verknüpfung bestätigt. Die Signale der Allylgruppe sind weder im ¹H- noch im ¹³C-NMR-Spektrum zu sehen. Stattdessen resonieren die Protonen der neu eingeführten CH₂-Gruppen als Multipletts bei $\delta = 3.11$ - 2.97 , 2.96 - 2.80 , 2.78 - 2.67 und 1.97 - 1.90 für H_e, H_d, H_c und H_b. Das ESI-Massenspektrum zeigt bei $m/z = 539$ einen Basispeak für das Konjugat [M+Na]⁺.

Das anomere Proton H-1 von Verbindung **110** resoniert im ¹H-NMR-Spektrum bei $\delta = 3.93$ als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.7$ Hz, welche charakteristisch für die α -Verknüpfung an C-1 ist. Die Signale der Allylgruppe sind nicht mehr zu finden. Stattdessen resonieren die CH₂-Gruppen des Linkers als Triplets bei $\delta = 3.22$ und 3.15 mit Kopplungskonstanten von jeweils $J = 6.5$ Hz für H_e und H_d, als Multipletts bei $\delta = 2.97$ - 2.83 und 2.09 - 2.02 für H_c und H_b. Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Basispeak bei $m/z = 630$ für das Konjugat [M+Na]⁺.

8 **Synthese des tumorassoziierten Antigens Sialyl-Tn**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit welcher komplexe Thiooligosaccharide schutzgruppenfrei in nur zwei Stufen aufgebaut werden können. Außerdem wurde eine Arrayplattform entwickelt, auf welcher die synthetisierten Thiooligosaccharide auf ihre biologischen Funktionen hin untersucht werden können. Nun sollte an einem biologisch relevanten Molekül die Effektivität des Konzeptes unter Beweis gestellt werden, indem dessen Bindungsaffinitäten mit denen des entsprechenden Thioanalogons verglichen werden. Thiozucker, welche ein Schwefel- anstelle eines Sauerstoffatoms in der glykosidischen Bindung tragen, haben andere physiochemische Eigenschaften als die natürlich vorkommenden O-Glykoside. Sie besitzen eine erhöhte Wasserlöslichkeit, werden von den meisten biologischen Systemen toleriert und die S-glykosidische Bindung ist stabil gegenüber enzymatischer und Säure/Base-Hydrolyse.^[154] Diese Eigenschaften machen sie zu vielversprechenden Verbindungen für therapeutische Anwendungen. Es wurde berichtet, dass thioverknüpfte Disaccharide als Inhibitoren für bestimmte Enzyme dienen.^[154, 165] Außerdem wurde gezeigt, dass thioverknüpfte Disaccharide das Wachstum von Tumorzellen merklich reduzierten und somit potentielle Antitumormittel sind.^[166] Jedoch fehlen bis jetzt detaillierte Studien, inwieweit Thiozucker als effektive Therapeutika eingesetzt werden können. Hierzu sollte die effektive chemoenzymatische Synthese in Kombination mit Untersuchungen auf Mikroarrays verwendet werden. Als biologisch relevantes Molekül sollte Sialyl-Tn als auch sein thioglykosidisch verknüpftes Analogon verwendet werden. Sialyl-Tn taucht als Motiv bei bestimmten Glykoproteinen, den sogenannten Muzinen auf, und ist ein tumorassoziiertes Antigen. Die biologischen Funktionen von Glykoproteinen werden zu einem großen Teil durch ihre Glykosylierungsmuster bestimmt.

Muzine sind Glykoproteine, bei welchen Oligosaccharide O-glykosidisch mit Serin- oder Threoninseitenketten des Proteins verknüpft sind. Bei Tumorzellen wird ein anormaler Glykosylierungspfad aktiviert, wodurch sich das Glykosylierungsmuster der auf ihrer Oberfläche präsentierten Glykoproteine ändert. Bei tumorassoziierten Muzinen tauchen die Oligosaccharidketten in verkürzter Form auf^[7], wodurch ein therapeutisches Potential

gegeben ist, diese Strukturen zur Auslösung von tumorspezifischen Immunantworten zu nutzen.^[167] Die muzinassoziierten Oligosaccharide werden über N-Acetylgalaktosamin an das Peptidrückgrat gebunden, welches man als „Tn-Antigen“ bezeichnet. Dieses wird durch weitere Glykosyltransferasen erweitert, wodurch komplexe O-verknüpfte Glykane entstehen. Während Muzine bei gesunden Zellen kaum Sialinsäurereste tragen, sind tumorassoziierte Muzine hochgradig sialyliert, was bei zahlreichen Krebsarten wie Eierstock-, Magen-, Lungen-, Darm-, Brust und Bauchspeicheldrüsenkrebs gezeigt werden konnte.^[168] Außerdem ist die Expression von Sialyl-Tn auf Tumorzellen mit einer schwachen Prognose und schlechten Chancen für eine Chemotherapie verbunden.^[169, 170] Sialyl-Tn kann also einerseits als histologischer Marker zur Diagnose von Tumoren als auch in Impfstoffen für eine selektive Tumorthherapie verwendet werden. Ein Tumoringfstoff, bei dem Sialyl-Tn mit einem Protein-Carrier von hohem Molekulargewicht konjugiert ist, befindet sich zur Zeit in der klinischen Phase III.^[171]

Für therapeutische Anwendungen muss Sialyl-Tn in ausreichenden Mengen synthetisiert werden. Jedoch wird die Synthese von Sialyl-Tn durch niedrige Ausbeuten, aufwendige Schutzgruppenchemie und schwierige Kontrolle der Stereochemie erschwert.^[172, 173] Die enzymatische Synthese von Sialyl-Tn ist zwar mithilfe von Sialyltransferasen möglich, jedoch sind die zur α -2,6-glykosidischen Übertragung der Sialinsäure auf N-Acetylgalaktosamin erforderlichen Sialyltransferasen membrangebundene Enzyme und somit nur schwer zu isolieren. Von den mehr als 20 bisher bekannten und klonierten Sialyltransferasen weisen nur vier die erforderliche α -2,6-Spezifität auf.

8.1 Synthese von Sialyl-Tn

Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten chemoenzymatischen Synthese von Thiooligosacchariden sollte thioglykosidisch verknüpftes Sialyl-Tn in wenigen Stufen darstellbar sein. Parallel dazu sollte das natürliche, O-glykosidisch verknüpfte Sialyl-Tn synthetisiert werden. Ojeda et al berichteten, dass zur Synthese von Sialyl-Tn Neuraminsäurechlorid mit N-Acetylgalaktosamin ohne die Einführung von Schutzgruppen α -2,6-glykosidisch verknüpft werden konnte.^[174] Die beschriebenen Ausbeuten für die Verknüpfung sind zwar gering, was im Gegenzug aber die Synthese um zusätzliche Stufen zur Einführung und Abspaltung von Schutzgruppen verkürzt. Um das Molekül später auf dem Mikroarray zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen immobilisieren

zu können, wurde zu Beginn der Synthese eine Allylgruppe in Position 1 durch Umsetzung mit Allylalkohol eingeführt. Der erforderliche Glykosyldonor Neuraminsäurechlorid wurde durch Veresterung der Säure und anschließender Umsetzung mit Acetylchlorid (siehe Kapitel 6.2.4) erhalten. Dieser wurde anschließend unter Aktivierung mit Silbertriflat mit Allyl-Tn umgesetzt und daraufhin die verbliebenen Schutzgruppen unter pH 10 entfernt (siehe Abbildung 8-1).

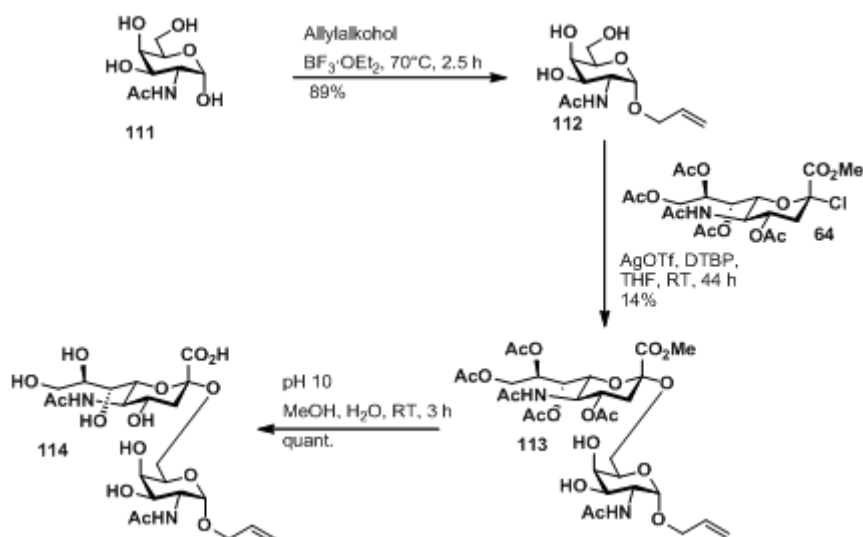


Abbildung 8-1: Synthese von Sialyl-Tn **113**. (DTBP = 2,6-di-*tert*-Butylpyridin)

8.2 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen **112**, **113** und **114**

Die Allylierung von **111** kann mithilfe der Massenspektrometrie als auch der NMR-Spektroskopie gezeigt werden. Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **112** resoniert das anomere Proton H-1 bei $\delta = 4.92$ als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.8$ Hz, was auf das ausschließliche Vorliegen des α -Glykosids hinweist. Im ^{13}C -NMR-Spektrum liegt das Signal für C-1 bei $\delta = 99.25$. Die Signale der Allylgruppe resonieren im ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 5.99, 5.37, 5.28, 4.23$ und 4.04 für $\text{H}_b, \text{H}_{c1}, \text{H}_{c2}, \text{H}_{a1}$ und H_{a2} und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.72, 120.85$ und 71.44 für C_b, C_c und C_a . Die Protonen der N-Acetylgruppe resonieren als Singulett bei $\delta = 2.06$ und die Acetylkohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 176.16$ und $\delta = 24.90$. Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Basispeak bei $m/z = 284$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Die Übertragung der Neuraminsäure auf den Tn-Baustein kann sowohl massenspektrometrisch als auch durch NMR-Spektroskopie gezeigt werden. Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **113** resoniert das anomere Proton H-1 bei $\delta = 4.86$ als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.8$ Hz. Im ^{13}C -NMR-Spektrum liegt das Signal für C-1 bei $\delta = 96.86$ und für C-2' bei $\delta = 100.12$. Die sieben Carbonylgruppen resonieren bei 173.94-169.63. Die Protonen der O-Acetylgruppen resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 2.16$ -2.00. Die Protonen der N-Acetylgruppen resonieren als Singulett bei $\delta = 1.86$. Der Methylester resoniert als Singulett bei $\delta = 3.85$. Das Signal des entsprechenden Kohlenstoffatoms lässt sich bei $\delta = 55.22$ erkennen. Die sechs weiteren Methylgruppen resonieren bei $\delta = 21.56$ -19.52. C-3' resoniert bei $\delta = 37.71$. Das entsprechende axiale Proton H-3'_e resoniert im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 2.66$ mit Kopplungskonstanten von $J = 4.7$ und 12.8 Hz. Das äquatoriale Proton H-3'_a resoniert als Multipllett bei $\delta = 2.12$ (siehe Abbildung 8-2). C-6 und C-9' resonieren im ^{13}C -NMR bei $\delta = 63.60$ und $\delta = 62.33$. Die charakteristischen Signale der Allylgruppe lassen sich sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum erkennen. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen H_b, H_{c,trans}, H_{c,cis}, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.97, 5.34, 5.20, 4.23$ und 4.07 -3.82. Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b, C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 134.47, 116.53$ und 68.22 . Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Basispeak bei $m/z = 757$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

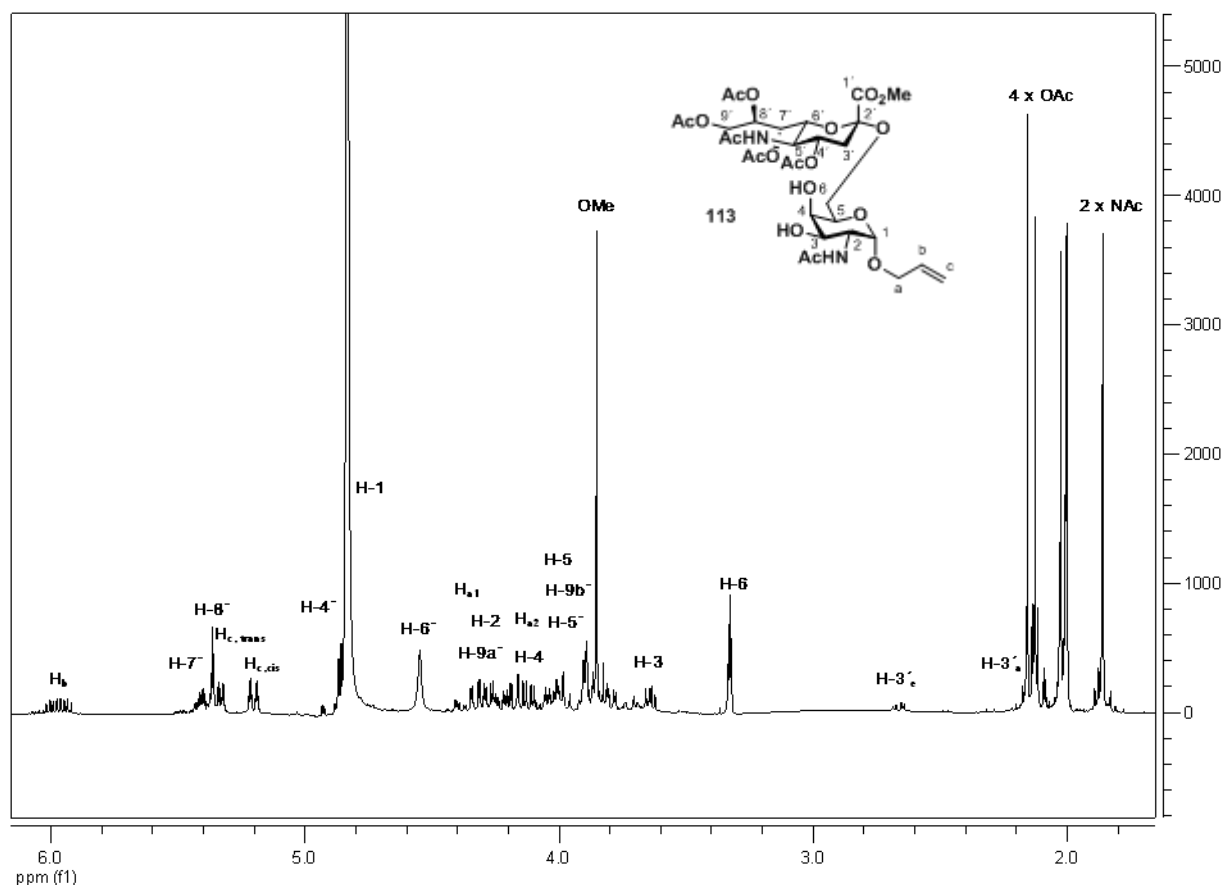


Abbildung 8-2: ^1H -NMR-Spektrum von **113** (400 MHz, CD_3OD).

Die Entfernung der Schutzgruppen zur Synthese von **114** konnte im ESI-Massenspektrum mit einem Basispeak bei $m/z = 551$ für das Konjugat $[\text{M}-\text{H}]^-$ nachgewiesen werden. Die Signale der O-Acetylgruppen sowie das des Methylesters tauchen weder im ^1H - noch im ^{13}C -NMR-Spektrum auf, was auf eine vollständige Entschüttung schließen lässt. C-1 resoniert im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 99.15$ und C-2' bei $\delta = 103.31$. Die Signale bei $\delta = 177.94$, 177.49 und 176.29 lassen sich den drei Carbonylkohlenstoffatomen zuordnen. Die Protonen der beiden N-Acetylgruppen resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 1.93$. Ihre entsprechenden Kohlenstoffatome resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 24.96$ und $\delta = 24.85$. Das Signal für C-3' lässt sich bei $\delta = 43.14$ erkennen. Das entsprechende axiale Proton H-3'e resoniert im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett eines Dubletts bei $\delta = 2.75$ mit Kopplungskonstanten von $J = 4.6$ und 12.4 Hz. Das äquatoriale Proton H-3'a resoniert als Multiplett bei $\delta = 2.07$ - 2.04 . Für C-6 lässt sich ein Signal bei $\delta = 66.59$ und für C-9' bei $\delta = 65.53$ finden. Die charakteristischen Signale der Allylgruppe lassen sich sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum erkennen. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen

H_b , $H_{c,trans}$, $H_{c,cis}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.99, 5.37, 5.29, 4.96$ und 4.23 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 136.59, 120.98$ und 71.61 . Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Basispeak bei $m/z = 757$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

8.3 Synthese von thioverknüpftem Sialyl-Tn

Das thioglykosidisch verknüpfte Sialyl-Tn sollte durch Umsetzung des Neuraminsäurethiols mit in Position 6 tosyliertem N-Acetylgalaktosamin erhalten werden. Jedoch entstand bei der Umsetzung kein Produkt, da der Angriff des Thiols aufgrund sterischer Hinderung durch die sperrige Tosylgruppe und axialständige Hydroxylgruppe an C-4 offensichtlich verhindert wurde. Selbst eine Erhöhung der Temperatur auf $130\text{ }^\circ\text{C}$ und die Verwendung von Mikrowellenstrahlung zur Überwindung sterischer Faktoren konnten keine Substitution der Tosylgruppe bewirken. Es wurde in allen Fällen lediglich das Edukt reisoliert. Die Verwendung einer Triflatgruppe anstelle des Tosylats in Position 6 sollte einerseits die Reaktivität erhöhen als auch die sterische Hinderung reduzieren. Zur regioselektiven Einführung des Triflats in Position 6 mussten zunächst die Hydroxylgruppen in Position 3 und 4 durch eine Isopropylidengruppe geschützt werden. Dies erfolgte durch Umsetzung mit Toluolsulfonsäure und 2,2-Dimethoxypropan. Zu dem 3,4-acetalisierten Baustein wurde Trifluormethansulfonsäureanhydrid zugegeben und so in Position 6 ein Triflat in einer Ausbeute von 18% eingeführt. Bei der Umsetzung des Triflats mit dem Neuraminsäurethiol erfolgte jedoch ebenfalls kein Angriff (siehe Abbildung 8-3). Auch wenn die Übertragung von Neuraminsäurethiol auf in Position 6 des tosylierten Glukosederivats möglich war (siehe Kapitel XX), konnte die Übertragung auf Position 6 von N-Acetylgalaktosamin selbst unter Verwendung des reaktiveren Triflats nicht ermöglicht werden. Somit scheint es, dass die Hydroxylgruppe an C-4, welche bei N-Acetylgalaktosamin im Gegensatz zur Glukose axial steht, die Oberseite des Zuckers zu stark abschirmt, so dass das Neuraminsäurethiol an C-6 nicht angreifen kann.

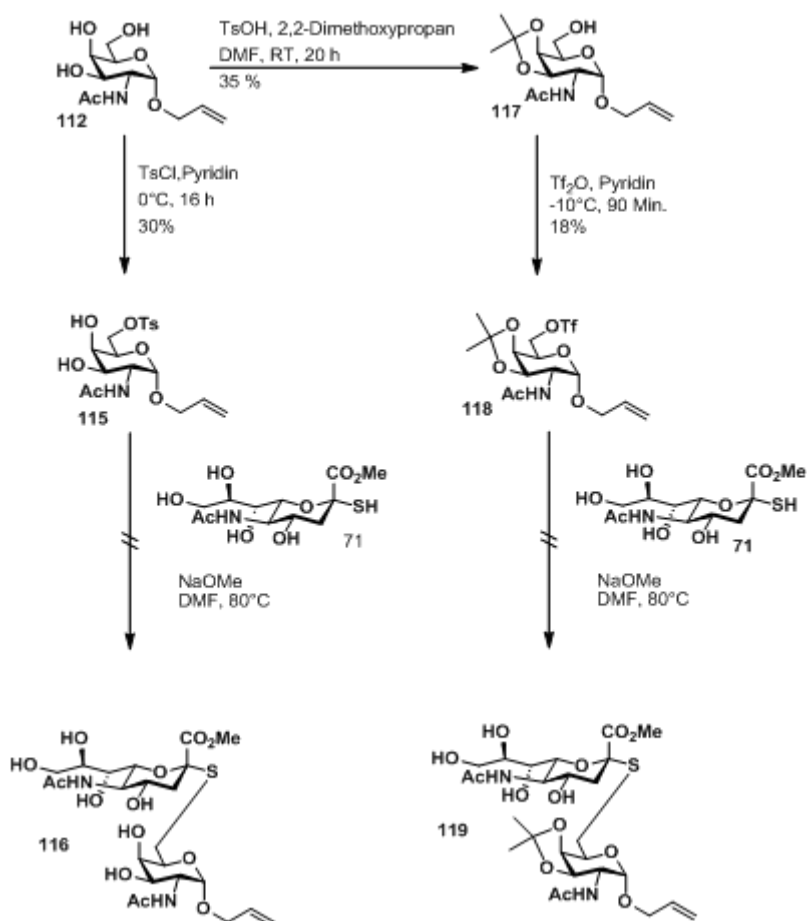


Abbildung 8-3: Zwei Synthesestrategien zur Synthese von thioverknüpftem Sialyl-Tn.

8.4 Diskussion der spektroskopischen Daten der Verbindungen 115, 117, und 118

Die Tosylierung von **112** konnte sowohl massenspektrometrisch als auch durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **115** resoniert das anomere Protons H-1 bei $\delta = 4.72$ als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.7$ Hz, welche die α -Verknüpfung der Allylgruppe bestätigt. Die Signale der aromatischen Protonen der Tosylgruppe resonieren jeweils als Dubletts bei $\delta = 7.72$ und $\delta = 7.26$ mit einer Kopplungskonstante von jeweils $J = 8.1$ Hz. Das Signal der Methylgruppe des Tosylats resoniert als Singulett bei $\delta = 2.36$ (siehe Abbildung 8-4). Die Protonen der N-Acetylgruppe resonieren als Singulett bei $\delta = 1.93$. Im ^{13}C -NMR-Spektrum resoniert C-1 bei $\delta = 96.60$, C-6 bei $\delta = 68.41$, die sechs aromatischen Protonen bei $\delta = 144.86$, 132.95 , 129.83 und 127.91 und die Methylgruppe des Tosylats bei $\delta = 23.30$. Für die beiden Kohlenstoffatome der N-Acetylgruppe lassen sich Signale bei $\delta = 172.40$ für das Carbonylkohlenstoffatom und bei $\delta = 21.63$ für die Methylgruppe erkennen. Die charakteristischen Signale der Allylgruppe lassen

sich sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum erkennen. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.79, 5.19, 5.13, 4.05$ und 3.85 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 133.40, 118.10$ und 69.57 . Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Basispeak bei $m/z = 757$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Basispeak bei $m/z = 438$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Das anomere Proton von Verbindung **117** resoniert als Dublett bei $\delta = 4.78$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.3$ Hz. Das entsprechende Signal für C-1 resoniert im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 98.03$. Die Methylgruppen der Isopropylidengruppe resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 1.47$ und $\delta = 1.31$ (siehe Abbildung 8-5). Die Signale der entsprechenden Kohlenstoffatome lassen sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 28.44$ und $\delta = 26.76$ erkennen. Das Signal bei $\delta = 110.52$ kann dem quartären Kohlenstoffatom der Isopropylidengruppe zugeordnet werden. Die N-Acetyl- und Allylgruppe lassen sich durch ihre charakteristischen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum erkennen. Die Protonen der N-Acetylgruppe resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 1.98$ und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 173.61$ und $\delta = 22.54$. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.97, 5.32, 5.18, 4.22\text{-}4.16$ und 3.99 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 135.25, 117.67$ und 69.39 . Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Basispeak bei $m/z = 324$ für das Konjugat $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

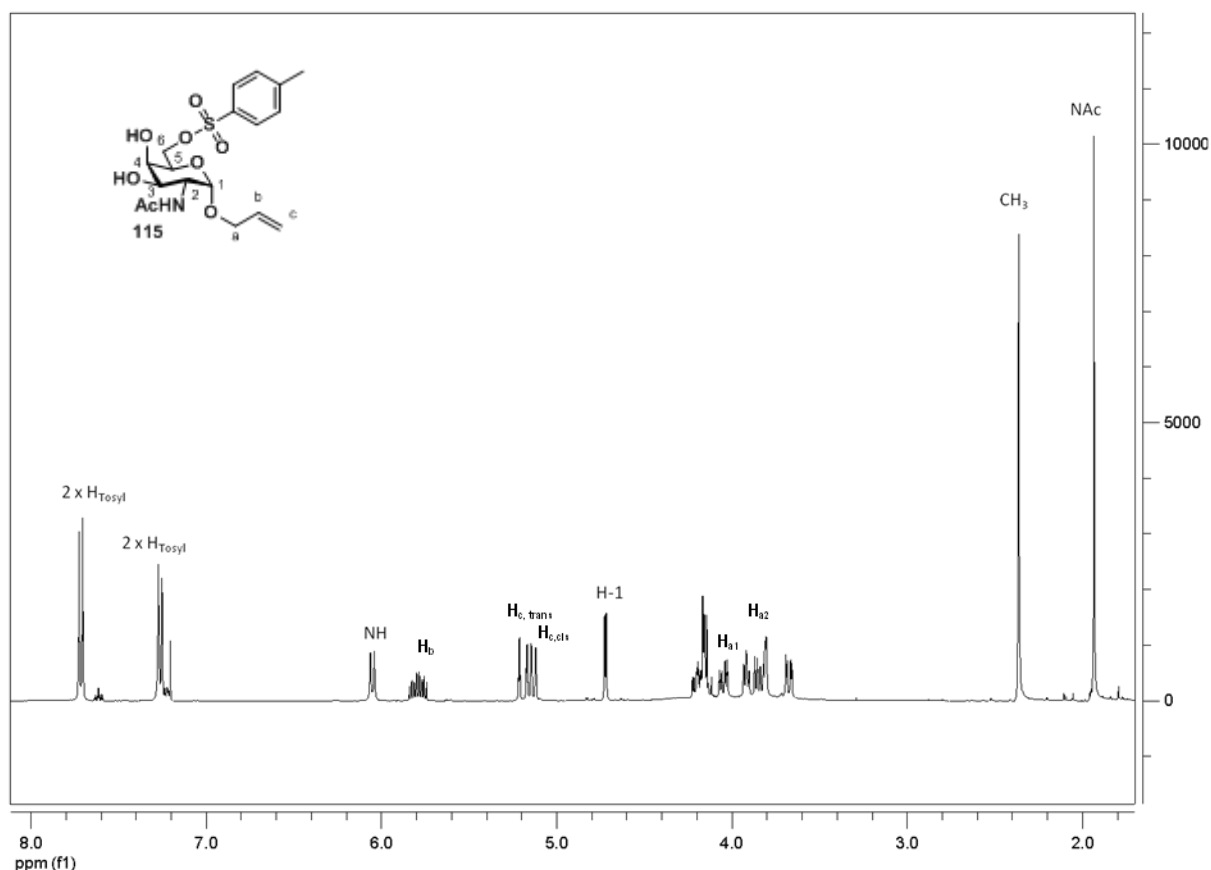


Abbildung 8-4: ^1H -NMR-Spektrum von **115** (400 MHz, CDCl_3).

Die Einführung des Triflats konnte mithilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Das CF_3 -Atom des Triflats **118** resoniert im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 128.03$. Das quartäre Kohlenstoffatom des Acetals zeigt ein Signal bei $\delta = 112.76$. Für die Methylgruppen des Acetals lassen sich Signale bei $\delta = 27.62$ und $\delta = 26.20$ finden. Die N-Acetyl- und Allylgruppe lassen sich durch ihre charakteristischen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum erkennen. Die Protonen der N-Acetylgruppe resonieren im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei $\delta = 2.10$ und im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 178.80$ und $\delta = 20.54$. Im ^1H -NMR-Spektrum resonieren die Allyl-Protonen H_b , $\text{H}_{c,\text{trans}}$, $\text{H}_{c,\text{cis}}$, H_{a1} und H_{a2} bei $\delta = 5.91$, 5.25 , 5.15 , 4.33 - 4.27 und 4.17 - 4.09 . Die Kohlenstoffatome der Allylgruppe C_b , C_c und C_a resonieren im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta = 137.53$, 121.63 und 71.64 . Für einen massenspektrometrischen Nachweis war das Triflat zu instabil.

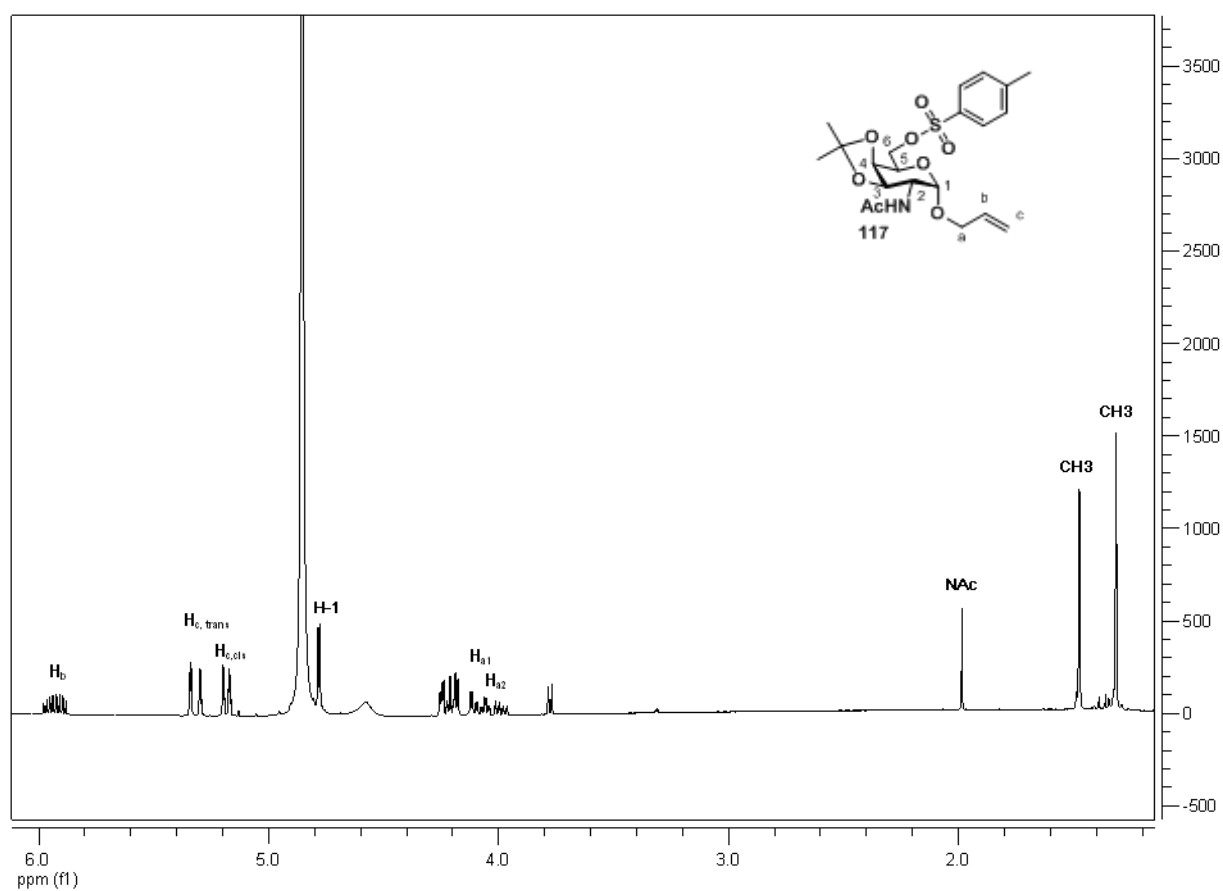


Abbildung 8-5: ^1H -NMR-Spektrum von **117** (400 MHz, CD_3OD).

9 Zusammenfassung

Kohlenhydrate sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Sie beeinflussen virale und bakterielle Infektionen, Tumorwachstum, Entzündungen und Wundheilung, die Auslösung von Immunantworten uvm. Durch ihre enorme strukturelle Vielfalt kodieren sie ein hohes Maß an Informationen, welche durch Proteine abgelesen werden. Die Entschlüsselung des sogenannten Glykocodes ist für das Verständnis ihrer biologischen Funktionen und der damit möglichen Entwicklung neuer Diagnosen und Therapien erforderlich. Die Untersuchung ihrer Funktionen wird durch ihre strukturelle Vielfalt erschwert. So ist die Isolierung homogener Glykoformen von Zellen oder Gewebe in ausreichenden Mengen nur begrenzt möglich. Die Synthese von Kohlenhydraten erfordert aufgrund der ähnlichen Reaktivität der Hydroxylgruppen die Verwendung von komplexen Schutzgruppenstrategien.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine schutzgruppenfreie chemoenzymatische Synthese entwickelt, mit der diverse verzweigte Thiooligosaccharide in nur zwei Stufen erhalten werden. Zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen wurde eine Mikroarray-Plattform geschaffen, welche die Untersuchung minimalster Mengen von Kohlenhydraten im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht. Hierbei wurden die Kohlenhydrate auf dem Chip nicht nur immobilisiert, wie es bei bisherigen Arrays üblich ist, sondern Glykosyltransferasen zur Modifikation der gebunden Kohlenhydrate eingesetzt und so die Diversität der Kohlenhydratbibliothek erhöht.

In Zellen werden Kohlenhydrate durch Glykosyltransferasen aufgebaut. Es gibt im Menschen mehr als 200 Glykosyltransferasene, welche sogenannte Leloir-Glykosyltransferasen exprimieren, durch deren Zusammenspiel die beachtliche Komplexität von Kohlenhydraten erreicht wird. Für die Kohlenhydrat-Synthese mithilfe von Leloir Glykosyltransferasen werden teure, oft auch synthetisch schwer zugängliche Substrate benötigt und nur kleine Mengen an Produkt erhalten. Hinzu kommt, dass diese Glykosyltransferasen ebenso schwer zugänglich sind und selbst etablierte Klonierungs- und Expressionsstrategien bei diesen Enzymen nicht effizient greifen. Eine Alternative bieten bakterielle Glukansucrasen, welche Polysaccharide mit unterschiedlichen Verknüpfungen aufbauen. Mithilfe geeigneter

Akzeptoren ist die Synthese von Oligosacchariden möglich, welche jedoch in der Regel lediglich α -1,6-Verknüpfungen aufweisen. Einige Arbeitsgruppen berichteten, dass die Kontrolle der Regioselektivität von Glykosidasen und Leloir-Glykosyltransferasen durch Modifikationen am Enzym oder Akzeptor erreicht werden konnte.^[143-146] In dieser Arbeit konnte durch Substratmodifikation die Regioselektivität von zwei Glukansucrasen dirigiert werden. Chemisches Blockieren von Position 6 des Substrates führte bei der Glykosyltransferase R (GTFR) aus *Streptococcus oralis* zur Änderung der Regioselektivität von α -1,6 zu α -1,3 und bei der Glykosyltransferase A (GTFA) aus *Lactobacillus reuteri* zur Änderung der Regioselektivität von α -1,6 zu α -1,4. Kohlenhydrat-basierte Wirkstoffe zeigen in manchen Fällen reduzierte Stabilität *in vivo*, da sie von Glykosidasen abgebaut werden. Synthetische Thiooligosaccharide werden von Glykosidasen nicht abgebaut und haben somit Potential als effektivere Wirkstoffe. Die Wahl einer Tosylgruppe zum Blockieren von Position 6 erlaubte die Synthese diverser verzweigter Thioglykoside durch nukleophile Substitution mit diversen Kohlenhydraten wie Glukose, Galaktose, Mannose, Neuraminsäure und Laktose. Die Substratdirigierung wurde nochmals durch die Tosylierung der Position 3 der Glukose erweitert. Dieses neue Akzeptorsubstrat wird ebenfalls vom Enzym erkannt und kann enzymatisch weiter glykosyliert werden. Die Tosylgruppe in Position 3 wurde ebenfalls mit Thiozuckern substituiert, was die Inversion der Konfiguration an Position 3 zur Folge hatte. Somit konnte aus der Glukose eine Alloose generiert werden. In Position 6 tosyliertes N-Acetylglukosamin konnte ebenfalls eingesetzt werden.

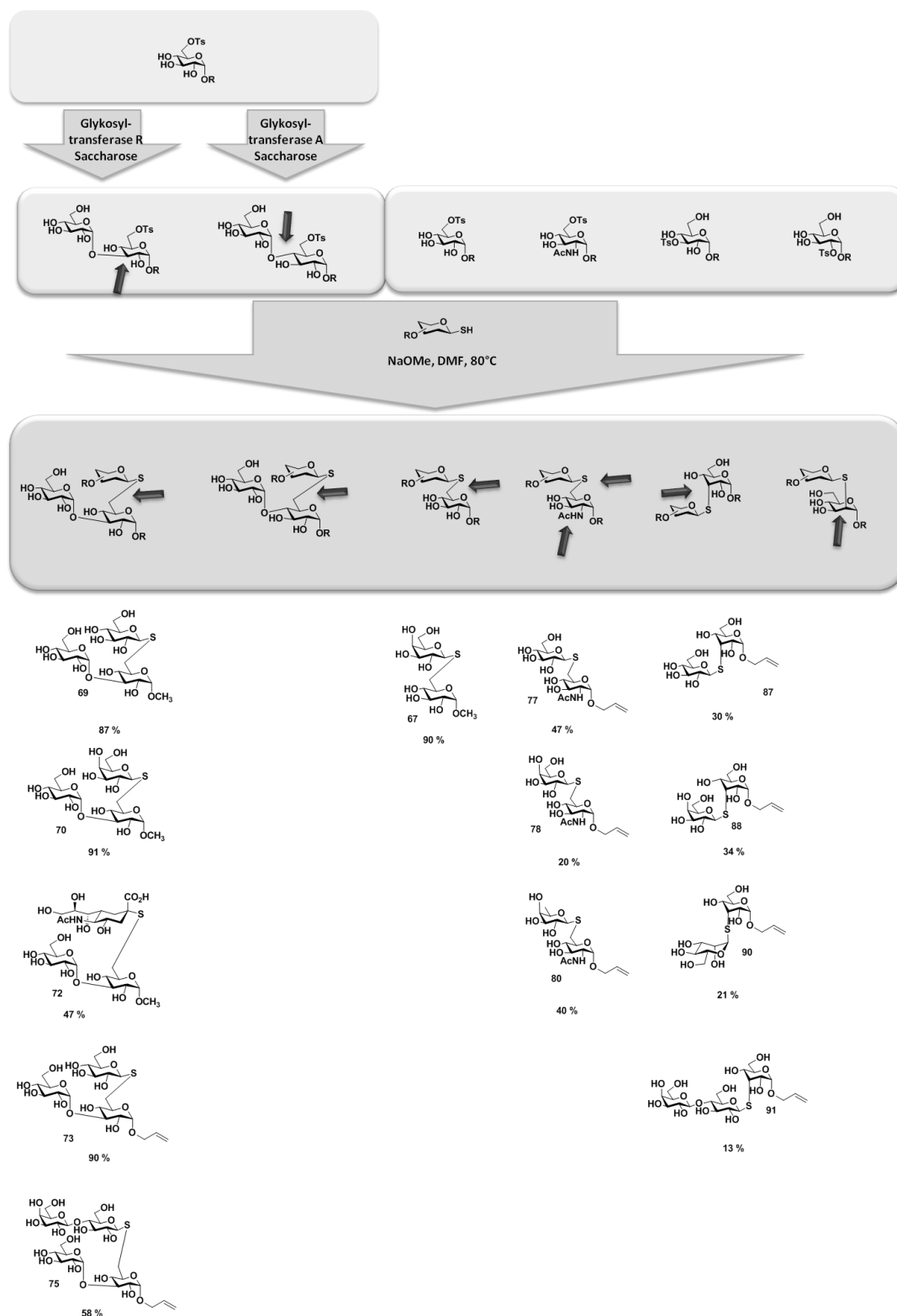


Abbildung 9-1: Methode zur zweistufigen chemoenzymatischen Synthese diverser komplexer Thiooligosaccharide. In Zukunft soll die Diversität der übertragbaren Zucker durch den Einsatz von Glykosyltransferasemutanten erhöht werden. Ferner sollen durch die Substitution der Tosylgruppe an C-2 mit Thiozuckern mannosehaltige Oligosaccharide synthetisiert werden.

Biologische Prozesse werden oft durch Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen ausgelöst. Aufgrund ihrer niedrigen Affinität zueinander sind dafür Multivalenzeffekte erforderlich. Kohlenhydrat-Mikroarrays bieten eine ausgezeichnete Plattform, Wechselwirkungen von Kohlenhydraten mit anderen Biomolekülen zu untersuchen. Die Kohlenhydrate auf den Arrays werden wie auf Zelloberflächen multivalent präsentiert und können bezüglich Wechselwirkungen mit Lektinen, Antikörpern, Viren oder ganzen Zellen untersucht werden. Die synthetisierten Thiooligosaccharide sollten auf ein Array gebunden und mit fluoreszenzmarkierten pflanzlichen Lektinen untersucht werden. Photochemisch konnte ein Linker eingeführt werden, über den ein Glukosederivat auf Mikrotiterplatten immobilisiert und erfolgreich mit Concanavalin A nachgewiesen werden konnte. Die Übertragung und Miniaturisierung auf einen Glaschip erforderte die Entwicklung eines geeigneten Linkersystems ebenso die Wahl einer geeigneten modifizierten Chipoberfläche. Nach initialen Versuchen mit Konzentrationsverläufen von gebundenem Kohlenhydrat und kohlenhydratbindenden Proteinen, sogenannten Lektinen, konnten verschiedene Kohlenhydrate mit vier verschiedenen Lektinen erfolgreich selektiv nachgewiesen werden. Es konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass auf einem Array immobilisierte Kohlenhydrate mit einer Glykosyltransferase modifiziert werden können, was im Vergleich zu gängigen Arrays ein enormer Vorteil ist.^[112] So kann die Diversität der auf dem Array präsentierten Glykan-Bibliothek durch Anhängen weiterer Zucker erneut gesteigert werden, ohne dass damit eine aufwendige Synthese in Lösung mit damit verbundenen Aufarbeitungsschritten notwendig wäre. Häufig sind einzelne angehängte Zucker von enormer Bedeutung für biologische Erkennungsprozesse. Auf dem hier verwendeten Mikroarray wurden mithilfe einer β -1,4-Galaktosyltransferase aus Kuhmilch die gebundenen Kohlenhydrate erweitert. Die Übertragung von Galaktose konnte durch den Verlust der Bindungsaffinität von Concanavalin A nachgewiesen werden. Um das Konzept an einem biologisch relevanten Molekül zu testen, wurde das tumorassoziierte Antigen Sialyl-Tn synthetisiert. Dessen Bindungsaffinitäten sollten mit denen des entsprechenden Thioanalogons verglichen werden. Die Synthese des thioverknüpften Sialyl-Tn war jedoch selbst unter Verwendung alternativer Synthesewege nicht möglich.

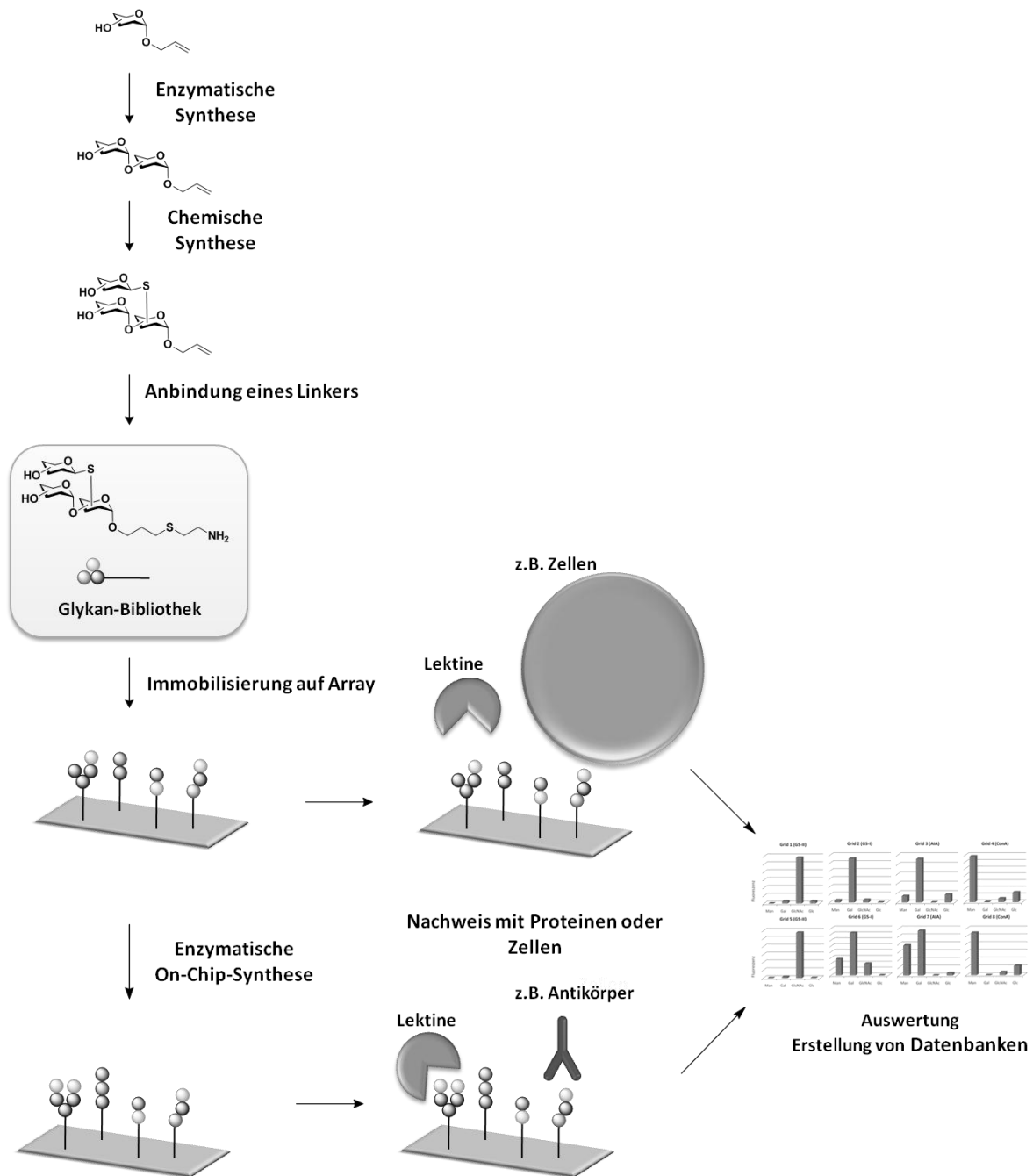


Abbildung 9-2: Ergebnisse und Potential des Mikroarrays: Durch eine zweistufige chemoenzymatische Synthese werden diverse komplexe Thiooligosaccharide aufgebaut, welche anschließend an einen Linker gekuppelt und kovalent auf Mikroarrays gebunden werden. Auf dem Array können die gebundenen Kohlenhydrate durch Zugabe von Enzymen weiter modifiziert und ihre Wechselwirkungen mit Proteinen untersucht werden. In Zukunft sollen sowohl weitere Enzyme zur On-Chip-Synthese als auch Antikörper oder ganze Zellen zur Untersuchung der biologischen Funktionen von Kohlenhydraten eingesetzt werden.

In Zukunft sollen sowohl weitere Kohlenhydrate auf dem Chip immobilisiert als auch zusätzliche Glykosyltransferasen zur Modifikation der gebunden Kohlenhydrate eingesetzt werden, um die Diversität der Kohlenhydratbibliothek zu erhöhen. Insbesondere bei Tumoren und Viren relevante Kohlenhydrate und deren Thioanaloga sollen synthetisiert und bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit Proteinen verglichen werden. Darüberhinaus bietet die Plattform die Möglichkeit, die gebundenen Kohlenhydrate durch weitere Proteine, Viren oder Zellen nachzuweisen, so dass das Potential der Thiooligosaccharide als Impfstoffkandidaten oder Biomarker erschlossen werden kann.

II EXPERIMENTELLER TEIL

10 Allgemeine Methoden

Alle Umsetzungen wurden- soweit sinnvoll- in ausgeheizten Glasapparaturen unter einem leichten Stickstoff- oder Argon-Überdruck durchgeführt. Lösungsmittel wurden entsprechend den üblichen Laboratoriumsmethoden destilliert und getrocknet. Käufliche Reagenzien wurden, wenn nicht anders erwähnt, ohne weitere Reinigung eingesetzt.

10.1 Verwendete Geräte

Schmelzpunkte: Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mithilfe des Schmelzpunktmessgerätes MEL-TEMP II der Firma *Labaratory Devices*.

Drehwerte: Die Messung der Drehwerte wurde mithilfe eines *Dr. Kernchen* Sucromat Polarimeters durchgeführt.

¹H-NMR-Spektren: Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit den Modellen AV II-300 (300 MHz), DRX-400 (400 MHz) und AV II-600 (600 MHz) der Firma *Bruker* aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala angegeben. Tetramethylsilan ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm) und Deuteriochloroform ($\delta_{\text{CDCl}_3} = 7.26$ ppm) wurden als interne Standards verwendet. Zur Kennzeichnung der Signalmultiplizität fanden folgende Abkürzungen Verwendung: br (breites Signal), s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett) und m (Multiplett).

¹³C-NMR-Spektren: Die ¹³C-NMR-Spektren wurden mit den Modellen AV II-300 (75 MHz), DRX-400 (100 MHz) und AV II-600 (150 MHz) der Firma *Bruker* aufgenommen. Die Multiplizitäten der Signale wurden in multipllett-selection-Experimenten (APT-Pulsfolge) bestimmt. Als interne Standards dienten Tetramethylsilan ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm) und Deuteriochloroform ($\delta_{\text{CDCl}_3} = 77.00$ ppm).

Massenspektren: Die Massenspektren wurden mit dem Modell MAT 8430 der Firma *Finnigan* mit der Elektronenspray-Ionisierungs-Methode (ESI) aufgenommen.

UV-Lampen: 6 W UV-Lampe NU-6 KL der Firma *Bena* und 350 W Hg-Dampflampe bei 100 mW/cm² der Firma *Oriel*.

10.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Zur dünnenschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktionen kamen DC-Fertigfolien Polygram SIL G/UV254, Schichtdicke 0.2 mm, der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co KG* zum Einsatz. Als Anfärbereagenz wurde eine wässrige Kaliumpermanganat-Lösung oder eine Lösung von *N*-(1-Naphtyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid (5 Gew.-%) und Schwefelsäure (5%) in Methanol verwendet. Bei UV-aktiven Substanzen diente darüber hinaus deren UV-Absorption zur Detektion.

Säulenfiltration und Säulenchromatographie: Für die chromatographische Aufreinigung der Substanzen wurde Kieselgel der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* (Korngröße 0.04-0.063 mm) bei erhöhtem Druck (Flash-Chromatographie) verwendet.

Größenausschlusschromatographie: Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine Biogel P-2 Säule verwendet. Das Wasser wurde durch Gefriertrocknung mit dem Modell Modulyo der Firma *Edwards* entfernt.

10.3 Verwendete Materialien für die Mikroarrays

Slides: Es wurden Mikrotiterplatten des Modells CovaLink™ NH Modules der Firma *Nunc* und Mikroarrayslides der Firmen *Genetix*, *ArrayIt*, *Greiner Bio-One* und *Nexterion* verwendet.

Scanner & Arrayer: Als Scanner wurde das Modell Sunrise der Firma *Tecan* für die Mikrotiterplatten und der ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* für die Mikroarrayslides verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Extinktion von 535 nm und einer Anregung bei 485 nm. Die Auswertung der Mikrotiterplatten erfolgte mit der Software Magellan von *Tecan*. Die Auswertung der Mikroarrays erfolgte mit der Software ScanAlyze. Zum Spotten der Slides wurde das Modell MicroCASTer von der Firma *Schleichel & Schuell* verwendet.

Lektine: Fluoreszenzmarkierte Lektine wurden von der Firma *EY Laboratories* (USA) bezogen.

Enzyme: β -1,4-Galaktosyltransferase aus Kuhmilch, UDP-Galaktose und α -Lactalbumin wurden von *Sigma-Aldrich* bezogen.

11 Synthese der Thiooligosaccharide

11.1 Synthese und Isolierung der Akzeptorprodukte

Enzymatische Synthese von *O*- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-[α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)]- α,β -D-glucopyranose (**37**)

Zu einer Reaktionsmischung von Saccharose **33** (292 mM) als Substrat und Laktose **36** (292 mM) als Akzeptor in Sörensen-Puffer wurde GTFR (110 UL⁻¹) zugegeben. Die Produktbildung wurde durch diskontinuierliche Analyse der Teilproben aus der Reaktionsmischung zu passenden Zeitintervallen bis zu 24 h untersucht. Das Produkt wurde durch Größenausschlusschromatographie isoliert.

$R_f = 0.20$ (Acetonitril/Wasser 8:2, 2 Durchläufe).

mp: ~ 225 °C

$[\alpha]_D = 83.3$ (c 1.0, MeOH).

ESI-MS m/z ., ber. für C₁₈H₃₂O₁₆Na: 527.4, gef. [M+Na]⁺.

β -Anomer:

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 5.33 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1''), 4.80-4.78 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1), 4.44-4.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.08-4.04 (td, $J = 3.0, 10.4$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 3.98-3.95 (m, 1H, H-5''), 3.90-3.89 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-4'), 3.89-3.76 (m, 4H, H-6, H-6''), 3.76-3.70 (m, 4H, H-3, H-3'', H-6'), 3.70-3.62 (m, 3H, H-4, H-3', H-4''), 3.55-3.49 (m, 2H, H-2', H-2''), 3.41-3.37 (dd, $J = 8.8, 7.8$ Hz, 1H, H-2).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 105.11 (C-1'), 100.04 (C-1''), 98.31 (C-1), 80.82 (C-4), 80.51 (C-2), 77.60 (C-5'), 75.33 (C-3), 75.07 (C-3''), 74.79 (C-3'), 73.96 (C-5''), 73.76 (C-5), 73.69 (C-2''), 73.24 (C-2'), 71.58 (C-4''), 70.81 (C-4'), 63.30 (C-6'), 62.35 (C-6''), 62.17 (C-6).

α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 5.41 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 5.07 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.45-4.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1'), 3.98-3.95 (m, 1H, H-5), 3.98-3.95 (m, 1H, H-3), 3.95-3.90 (m, 1H, H-5'), 3.90-3.89 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-4'), 3.82-3.68 (m, 8H, H-4, H-6, H-5', H-6', H-3'', H-6''), 3.68-3.62 (m, 2H, H-2, H-3'), 3.55-3.49 (m, 2H, H-2', H-2''), 3.46-3.41 (m, 1H, H-4').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 105.21 (C-1'), 98.43 (C-1), 91.43 (C-1), 80.51 (C-4), 77.78 (C-2), 77.60 (C-5'), 76.89 (C-5), 75.02 (C-3'), 74.79 (C-3'), 73.65 (C-2''), 73.24 (C-2'), 72.23 (C-3), 72.11 (C-5''), 71.46 (C-4'), 70.83 (C-4'), 63.30 (C-6'), 62.48 (C-6), 62.35 (C-6').

11.1.1 Akzeptorprodukte der tosylierten Zucker

Zu einer Reaktionsmischung von **33** (292 mM - 584 mM) als Substrat und 6-*O*-*para*-Toluolsulfonyl-D-glucopyranosid (151 mM) als Akzeptor im Reaktions-Puffer wurde GTFR oder GTFA (270 μL^{-1}) zugegeben. Die Produktbildung wurde durch diskontinuierliche Analyse der Teilproben aus der Reaktionsmischung zu passenden Zeitintervallen bis zu 36 h untersucht. Das Produkt wurde durch Größenausschlusschromatographie isoliert.

Enzymatische Synthese von *O*- α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-[6-*O*-*para*-toluolsulfonyl]-D-glucopyranosid (43**)**

Die Reaktion wurde mit **33** (584 mM), **42** (151 mM) und GTFR durchgeführt.

$R_f = 0.46$ (2-Propanol/EtOAc/Wasser 6:3:1).

$[\alpha]_D = +69.8$ (c 1.0, MeOH).

ESI-MS m/z ., ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{13}\text{Na}$ 519.5, gef. 519.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

β -Anomer:

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.93-7.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.58-7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 5.37 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1'), 4.66-4.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-1), 4.43-4.34 (m, 2H, H-6), 4.06-3.99 (m, 2H, H-5, H-5'), 3.88-3.82 (m, 3H, H-4, H-6'), 3.82-3.78 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-3'), 3.68- 3.64 (m, 1H, H-3), 3.64-3.60 (m, 1H, H-2'), 3.52-3.47 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-4'), 3.37-3.33 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-2), 2.52 (s, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 149.02 (Aryl- C_{quart}), 132.84 (Aryl- C_{quart}), 132.46 (2 Aryl-C), 130.12 (2 Aryl-C), 101.23 (C-1'), 98.24 (C-1), 84.20 (C-3), 75.07 (C-4), 74.81 (C-2, C-3'), 73.88 (C-5), 73.82 (C-2'), 71.63 (C-4'), 71.54 (C-6), 70.97 (C-5'), 62.60 (C-6'), 23.06 (CH_3).

α -Anomer:

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.91-7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.58-7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 5.36 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1'), 5.19 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 4.43-4.34 (m, 2H, H-6), 4.06-3.99 (m, 2H, H-5, H-5'), 3.88-3.83 (m, 4H, H-3, H-4, H-6'), 3.82-3.77 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-3'), 3.64- 3.60 (m, 1H, H-2'), 3.59-3.56 (dd, $J = 3.8, 9.85$ Hz, 1H, H-2), 3.54-3.49 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-4'), 2.52 (s, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 148.96 (Aryl- C_{quart}), 132.69 (Aryl- C_{quart}), 132.46 (2 Aryl-C), 130.12 (2 Aryl-C), 101.27 (C-1'), 94.48 (C-1), 81.70 (C-3), 75.07 (C-4, C-3'), 74.01 (C-2'), 73.88 (C-5), 72.07 (C-2), 71.81 (C-6), 71.63 (C-4'), 70.97 (C-5'), 62.46 (C-6'), 23.06 (CH_3).

Enzymatische Synthese von 1-*O*-Methyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-[6-*O*-*para*-toluolsulfonyl]- α -D-glucopyranosid (45)

Die Reaktion wurde mit **33** (292 mM), **44** (151 mM) und GTFR durchgeführt.

$R_f = 0.51$ (EtOAc/2-Propanol /Wasser 6:3:1).

mp: 165 °C.

$[\alpha]_{\text{D}} = +120.4$ (c 1.0, MeOH).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.80-7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.51-7.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 4.96-4.95 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H-1'), 4.57-4.56 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 4.24-4.21 (dd, $J = 10.8, 1.9$ Hz, 1H, H-6'_a), 4.15-4.12 (dd, $J = 10.8, 5.8$ Hz, 1H, H-6'_b), 3.76-3.71

(ddd, $J = 9.8, 5.9, 2.2$ Hz, 1H, H-5), 3.65-3.61 (dd, $J = 11.5, 2.2$ Hz, 1H, H-6_a), 3.59-3.55 (ddd, $J = 10.8, 5.8, 1.8$ Hz, 1H, H-5'), 3.53-3.48 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3), 3.46-3.42 (m, 1H, H-6_b), 3.45-3.41 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-3'), 3.34-3.31 (dd, $J = 9.8, 3.6$ Hz, 1H, H-2), 3.24 (s, 3H, OCH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 145.02 (Aryl-C_{quart}), 132.32 (Aryl-C_{quart}), 130.17 (2 Aryl-C), 127.65 (2 Aryl-C), 99.75 (C-1'), 99.69 (C-1), 82.49 (C-3), 73.48 (C-3'), 72.64 (C-4), 72.48 (C-2'), 70.17 (C-5), 69.98 (C-2), 69.85 (C-6'), 69.13 (C-4'), 69.02 (C-5'), 60.83 (C-6), 54.65 (OCH₃), 21.13 (CH₃).

ESI-MS: m/z : ber. für C₂₀H₃₀O₁₃SNa: 533.5; gef. 533.5 [M+Na]⁺.

Chemische Synthese von 1-*O*-Allyl-6-*O*-*para*-toluolsulfonyl- α -D-glucopyranosid (**46**)

para-Toluolsulfonylchlorid (1.22 g, 6.36 mmol) wurde zu einer Lösung von 1-*O*-Allyl- α -D-glucopyranosid (1.4 g, 6.36 mmol) in Pyridin (40 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand durch Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 5:1) aufgereinigt, wonach das Tosylat **46** als weißer Feststoff erhalten wurde (1.10 g, 2.94 mmol, 46%).

$R_f = 0.79$ (CH₂Cl₂/MeOH 5:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Aryl-H), 5.93 (dddd, $J = 17.2, 10.4, 6.1, 5.3$ Hz, 1H, H_b), 5.31 (qd, $J = 17.2, 1.7$ Hz, 1H, H_{c,trans}), 5.17 (ddd, $J = 10.4, 3.1, 1.3$ Hz, 1H, H_{c,cis}), 4.74 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-1), 4.34 (dd, $J = 10.8, 1.9$ Hz, 1H, H-6_a), 4.20 (dd, $J = 10.8, 6.1$ Hz, 1H, H-6_b), 4.12 (dd, $J = 12.9, 5.3$ Hz, 1H, H_{a1}), 3.96 (dd, $J = 12.9, 6.1$ Hz, 1H, H_{a2}), 3.73 (ddd, $J = 10.1, 6.1, 1.9$ Hz, 1H, H-5), 3.62 (dd, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3), 3.35 (dd, $J = 9.4, 3.7$ Hz, 1H, H-2), 3.23 (dd, $J = 10.1, 9.4$ Hz, 1H, H-4), 2.45 (s, 3H, CH₃).

¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 146.38 (Aryl-C_{quart}), 135.26 (C_b), 134.31 (Aryl-C_{quart}), 130.88 (2 Aryl-C), 129.06 (2 Aryl-C), 117.78 (C_c), 99.04 (C-1), 74.82, 73.08, 71.28, 71.14 (CH), 70.98 (CH₂), 69.44 (CH₂), 21.60 (CH₃).

Enzymatische Synthese von 1-O-Allyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O-[6-O-*para*-toluolsulfonyl]- α -D-glucopyranosid (47)

Die Reaktion wurde mit **1** (584 mM), **46** (151 mM) und GTFR durchgeführt.

$R_f = 0.59$ (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

mp: 172 °C.

$[\alpha]_D = +69.4$ (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 7.78-7.76 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.49-7.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Aryl-H), 5.92-5.82 (ddd, $J = 17.3, 10.5, 5.4$ Hz, 1H, H_b), 5.31-5.27 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.16-5.14 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.96-4.95 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, $\text{H-1}'$), 4.69-4.68 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-1), 4.23-4.20 (dd, $J = 10.8, 1.5$ Hz, 1H, $\text{H-6}'_a$), 4.14-4.10 (dd, $J = 10.8, 5.7$ Hz, 1H, $\text{H-6}'_b$), 4.05-4.01 (dd, $J = 13.3, 6.1$ Hz, 1H, H_{a1}), 3.91-3.86 (dd, $J = 13.3, 5.4$ Hz, 1H, H_{a2}), 3.65-3.60 (m, 2H, $\text{H-5}'$, H-6_a), 3.57-3.52 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3), 3.46-3.41 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, $\text{H-3}'$), 3.45-3.41 (m, 2H, H-5 , H-6_b), 3.35-3.31 (m, 2H, H-2 , $\text{H-4}'$), 3.25-3.22 (dd, $J = 9.7, 3.7$ Hz, 1H, $\text{H-2}'$), 3.11-3.06 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-4), 2.41 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 145.34 (Aryl- C_{quart}), 132.46 (Aryl- C_{quart}), 134.58 (C_b), 130.42 (2 Aryl-C), 127.85 (2 Aryl-C), 117.21 (C_c), 99.95 ($\text{C-1}'$), 98.09 (C-1), 82.65 (C-3), 73.63 ($\text{C-3}'$), 72.81 (C-5), 72.64 ($\text{C-2}'$), 70.36 (C-4), 70.12 (C-2), 70.03 ($\text{C-6}'$), 69.45 ($\text{C-5}'$), 69.37 ($\text{C-4}'$), 67.86 (C_a), 61.03 (C-6), 21.35 (CH_3).

ESI-MS: m/z : ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{O}_{13}\text{SNa}$: 559.6; gef. 559.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Enzymatische Synthese von 1-O-Methyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-[6-O-*para*-toluolsulfonyl]- α -D-glucopyranosid (48)

Die Reaktion wurde mit Saccharose **1** (584 mM), **44** (151 mM) und GTFA durchgeführt.

$R_f = 0.42$ (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

mp: 169 °C, lit.^[175] mp: 154-155 °C.

$[\alpha]_D = +98.8$ (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 7.80-7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.46-7.44 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 5.25-5.24 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.61-4.60 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 4.35-4.33 (m, 2H, H-6'), 3.83-3.78 (dd, $J = 9.8, 8.8$ Hz, 1H, H-3), 3.66-3.61 (dd, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 1H, H-6_a), 3.57-3.55 (m, 3H, H-3', H-5, H-6_b), 3.52-3.47 (dd, $J = 10.0, 8.8$ Hz, 1H, H-4), 3.51-3.40 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-4'), 3.49-3.46 (dd, $J = 9.8, 3.8$ Hz, 1H, H-2), 3.47-3.40 (m, 1H, H-5'), 3.41-3.38 (dd, $J = 9.9, 3.8$ Hz, 1H, H-2'), 3.28 (s, 3H, OCH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 149.61 (Aryl- C_{quart}), 133.69 (Aryl- C_{quart}), 133.09 (2 Aryl-C), 130.68 (2 Aryl-C), 102.72 (C-1'), 101.86 (C-1), 76.00 (C-3), 79.64 (C-4), 75.56 (C-5'), 75.47 (C-3'), 74.59 (C-2'), 73.53 (C-2), 72.76 (C-6'), 71.74 (C-4'), 70.49 (C-5), 62.86 (C-6), 58.05 (OCH_3), 23.68 (CH_3).

ESI-MS: m/z : ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_{13}\text{SNa}$: 533.5; gef. 533.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

11.1.2 Synthese der acetylierten Thioglykoside: Allgemeine Vorschrift A.

Zu einer Lösung von Thiozucker (1 Äquiv.) in DMF (1 mL/0.10 mmol Zucker) wurde NaH (1.3 Äquiv.) bei 0 °C zugegeben. Nach 1 h unter Rühren wurden tosylierter Zucker (1 Äquiv.) und Kryptofix (0.2 Äquiv.) in DMF (1 mL/0.10 mmol Zucker) zugegeben und 6.5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen, mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das acetylierte Thiosaccharid.

11.1.3 Synthese der Thioglykoside: Allgemeine Vorschrift B.

Zu einer Lösung von Thiozucker (1 Äquiv.) in MeOH (1 mL/0.10 mmol Zucker) wurde NaOMe-Lösung (2.7 Äquiv.) bei RT gegeben. Nach 2 h unter Rühren wurde die Lösung unter N_2 -Atmosphäre zur Trockene eingengt. Anschließend wurde eine Lösung des tosylierten Zuckers (1 Äquiv.) in DMF (1 mL/ 0.10 mmol Zucker) zugegeben und bei 80 °C bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographische Aufreinigung lieferten das Thiosaccharid.

Chemische Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*S*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*-6-thio-1,2,3,4,-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (53**)**

Vorschrift A mit **51** (40 mg, 0.11 mmol), NaH (3.4 mg, mmol), **52** (55 mg, 0.11 mmol) und Kryptofix (4.8 mg, 0.013 mmol) lieferte nach Rühren über 6.5 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/EtOAc 7:4) **53** als weißen Feststoff (57 mg, 0.082 mmol, 75%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.64 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-1), 5.38-5.34 (m, 1H), 5.29 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz), 5.19 – 5.12 (m, 1H), 5.07-5.03 (m, 2H), 5.01-4.89 (m, 3H), 4.57 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 4.16-4.13 (m, 1H), 4.06 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz), 4.07-4.05 (m, 1H), 3.82-3.75 (m, 1H), 2.09, 2.06, 2.02, 2.00, 1.99, 1.96, 1.94, 1.91 (8 s, 24 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170.41, 170.22, 170.06, 170.00, 169.77, 169.55, 169.23, 168.90 (8 CO), 91.65 (C-1), 83.44, 75.69, 74.84, 74.48, 72.65, 71.81, 71.18, 70.31, 68.16 (C-6'), 67.32 (2C), 30.37 (C-6), 22.68, 20.76, 20.66, 20.64, 20.53 (8 CH_3).

Chemische Synthese von 1,2,3,6-Tetra-*O*-acetyl-*S*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-thio-1,2,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (55**)**

Vorschrift A mit **54** (12 mg, 0.03 mmol), NaH (1.0 mg, mmol), **50** (25 mg, 0.03 mmol) und Kryptofix (1.4 mg, 0.004 mmol) lieferte nach Rühren über 6.5 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/EtOAc 3:2) von **55** als weißen Feststoff (10 mg, 0.01 mmol, 31%).

$[\alpha]_{\text{D}} = +45.8$ (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.55 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-1), 5.28-4.84 (m, 7H), 5.18 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-1'), 5.09 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 4.71 (dd, 1H, $J = 3.5, 10.3$ Hz, H-2'), 4.57 (dd, 1H, $J = 2.7, 10.1$ Hz), 4.24-3.99 (m, 5H), 4.05 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz), 3.85 (t, 1H, $J = 9.3$ Hz), 3.66-3.55 (m, 2H), 2.08, 2.06, 2.03, 2.00, 1.99, 1.98, 1.97, 1.92 (10 s, 33H, CH_3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_{26}\text{SNa}$: 1005.3; gef. 1005.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Chemische Synthese von 1,2,3,6-Tetra-*O*-acetyl-*S*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-thio-1,2,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (56**)**

Vorschrift A mit **51** (21 mg, 0.06 mmol), NaH (1.8 mg, mmol), **50** (46 mg, 0.06 mmol) und Kryptofix (2.5 mg, 0.007 mmol) lieferte nach Rühren über 6.5 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/EtOAc 3:2) **56** als weißen Feststoff (20 mg, 0.02 mmol, 34%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.54 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-1), 5.36 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz, H-1'), 5.25 (t, 1H, $J = 9.7$ Hz), 5.20 (dd, 1H, $J = 3.5, 13.6$ Hz), 5.14-5.09 (m, 1H), 5.07 (dd, 1H, $J = 2.5, 10.0$ Hz), 5.04-4.96 (m, 4H), 4.93 (dd, 1H, $J = 3.7, 10.1$ Hz, H-2'), 4.19-4.05 (m, 8H), 4.15 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 3.86 (dd, 1H, $J = 2.5, 8.8$ Hz), 2.09, 2.08, 2.03, 2.01, 2.00, 1.99, 1.97, 1.95, 1.93, 1.92, 1.91 (11s, 33H, CH_3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_{26}\text{SNa}$: 1005.3; gef. 1005.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Methyl 5-acetamido-2,3,5-trideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid **63**

N-Acetylneuraminsäure **62** (0.4 g, 1.3 mmol) und Amberlite IR-120 H^+ (0.4 g) wurden in MeOH (15 mL) gelöst. Es wurde über Nacht gerührt und anschließend Amberlite IR 120 H^+ (0.4 g) zugegeben. Es wurde 7 h gerührt, der Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **63** wurde als weißer Feststoff (305 mg, 0.94 mmol, 73%) erhalten.

R_f 0.28 (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 4.12-3.98 (m, 2H, H-4, H-6), 3.88-3.81 (m, 2H, H-5, H-9_a), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (ddd, $J = 3.4, 6.0, 9.0$ Hz, 1H, H-8), 3.64 (dd, $J = 6.0, 11.2$ Hz, 1H, H-9_b), 3.50 ($J = 1.3, 9.0$ Hz, 1H, H-7), 2.24 (dd, $J = 12.9, 4.9$ Hz, 1H, H-3_e), 2.03 (s, 3H, NAc), 1.91 (dd, $J = 11.2, 12.9$ Hz, 1H, H-3_a).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ 174.85 (C-1), 171.50 (CO), 96.41 (C-2), 71.83 (C-8), 71.38 (C-7), 69.93 (C-6), 67.59 (C-4), 64.58 (C-9), 54.07 (OCH_3), 52.86 (C-5), 40.44 (C-3), 22.38 (CH_3).

Methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-chloro-3,5-dideoxy-D-glycero- β -D-galacto-2-nonulopyranosid (64)

Acetylchlorid (10.4 mL, 0.12 mol, 133 Äquiv.) wurde tropfenweise zu eisgekühltem Neuraminat **63** (277 mg, 0.86 mmol) gegeben. Die Lösung wurde auf RT erwärmt. Nach 48 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum durch Zugabe von Toluol entfernt. Das Chlorid **64** wurde als weißer Feststoff erhalten (436 mg, 0.86 mmol, quant.).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 5.49-5.29 (m, 3H, NH, H-7, H-8), 5.22-5.18 (m, 1H, H-6), 5.02-4.97 (m, 1H, H-4), 4.26 (dd, $J = 2.6, 12.5$ Hz, 1H, H-9_a), 4.12-4.01 (m, 1H, H-5), 3.88 (dd, $J = 5.9, 12.5$ Hz, 1H, H-9_b), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 2.60 (dd, $J = 4.5, 13.9$ Hz, 1H, H-3_e), 2.17 (s, 3H, NAc), 2.00 (m, 1H, H-3_a), 1.96 (s, 3H, CH_3), 1.94 (s, 3H, CH_3), 1.90 (s, 3H, CH_3), 1.87 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.92 (CO), 170.60 (CO), 170.37 (CONH), 169.91, 169.70 (3 CO), 165.58 (C-1), 96.58 (C-2), 73.89 (C-6), 69.99 (C-7), 68.72 (C-4), 66.86 (C-8), 62.05 (C-9), 53.75 (OCH_3), 48.68 (C-5), 40.61 (C-3), 23.11 (NHCH_3CO), 21.40, 20.90, 20.81, 20.74, 20.71 (5 CH_3).

Methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-*S*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid (65)

Eine Lösung des Chlorids **64** (335 mg, 0.66 mmol) in trockenem Aceton (2.5 mL) bei 4 °C wurde zu einer Lösung von Kaliumthioacetat (151 mg, 1.0 mmol) in Aceton (2.5 mL) bei 4 °C gegeben. Die Mischung wurde auf RT erwärmt und 1 h stark gerührt. KCl und überschüssiges Thioacetat wurden durch Filtration entfernt und die Salze mit CHCl_3 gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden unter Vakuum einrotiert, der Rückstand in CHCl_3 (100 mL) gelöst, die Lösung mit 0.1 M HCl und Wasser (3 mal) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/Pentan 4:1) lieferte **65** (181 mg, 0.33 mmol, 50%).

$R_f = 0.18$ (EtOAc/Pentan 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.38 (dd, $J = 10.0, 1$ Hz, NH), 5.30 (dd, $J = 6.3, 2.4$ Hz, 1H, H-7), 5.16 (dt, $J = 6.3, 2.5$ Hz, 1H, H-8), 4.84 (ddd, $J = 11.7, 10.5, 4.6$ Hz, 1H, H-4), 4.60 (dd, $J = 10.8, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 4.36 (dd, $J = 12.4, 2.5$ Hz, 1H, H-9_a), 4.06 (m, 1H, H-5), 3.96 (dd, J

= 12.4, 6.3 Hz, 1H, H-9_b), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.56 (dd, J = 12.9, 4.6 Hz, 1H, H-3_e), 2.21 (s, 3H, AcS), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.01 (m, 1H, H-3_a), 1.96 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 1.81 (s, 3H, NAc).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 191.47 (SAc), 170.66, 170.64, 170.36, 170.24, 170.00, 169.29 (6 CO), 84.34 (C-2), 75.14 (C-6), 70.78, 68.84, 67.83 (C-4, C-7, C-8), 62.41 (C-9), 53.25 (OCH₃), 48.69 (C-5), 37.33 (C-3), 29.94 (SAc), 22.95, 20.85, 20.68, 20.65, 20.63 (5 CH₃).

Chemische Synthese von 1-O-Methyl-2,3,4,-tetra-O-acetyl-[2,3,4,6,tetra-O-acetyl-S-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-O-6-thio]-α-D-glucopyranosid (67)

Vorschrift B mit **66** (23 mg, 0.063 mmol), NaOMe (22 μL 5.4 M Lösung, 0.12 mmol) und **44** (41 mg, 0.06 mmol) lieferte nach 72 stündigem Rühren **67** (21 mg, 0.056 mmol, 90%) als weißen Feststoff nach präparativer DC (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

mp: 180 °C.

[α]_D = +66.7 (c 0.1, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.56 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H-1'), 3.86 (dd, 1H, J = 2.0, 12.3 Hz, H-6'_a), 3.83-3.75 (m, 1H), 3.67 (dd, 1H, J = 5.3, 12.3 Hz, H-6'_b), 3.58-3.50 (m, 3H), 3.45-3.24 (m, 4H), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 3.37 (d, 1H, J = 9.9 Hz), 3.16 (dd, 1H, J = 2.5, 14.2 Hz, H-6_a), 2.88 (dd, 1H, J = 8.8, 14.2 Hz, H-6_b).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 102.06 (C-1), 88.88 (C-1'), 82.63, 79.99, 75.75, 75.28 (2C), 74.35, 74.05, 72.28, 63.69 (C-6'), 58.08 (OCH₃), 34.19 (C-6).

Das Produkt **67** (6 mg, 0.016 mmol) wurde in Pyridin gelöst und Essigsäureanhydrid (6 mL) und 4-Di(methylamino)pyridin (0.03 mg, 0.01 Äquiv.) zugegeben. Man ließ über Nacht rühren und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ gelöst, mit Wasser gewaschen (2 mal) und über MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels lieferte das acetylierte Disaccharid als weißen Feststoff (9 mg, 0.014 mmol, 85%).

[α]_D = +54.3 (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.37 (dd, 1H, $J = 9.3, 10.1$ Hz), 5.14 (t, 1H, $J = 9.3$ Hz), 5.01 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, $\text{H-1}'$), 4.95 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.90-4.80 (m, 3H), 4.60 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz), 4.24-4.01 (m, 2H), 4.19 (dd, 1H, $J = 5.1, 12.5$ Hz, $\text{H-6}'_b$), 4.06 (dd, 1H, $J = 2.3, 12.5$ Hz, $\text{H-6}'_a$), 3.94-3.87 (m, 1H), 3.67-3.62 (m, 1H), 3.36 (s, 3H, OCH_3), 2.05, 2.01, 1.99, 1.96, 1.93 (6s, 21H, CH_3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{17}\text{SNa}$: 689.6; gef. 689.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Chemische Synthese von Methyl-*S*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-thio- α -D-glucopyranosid (69**)**

Vorschrift B mit **68** (50 mg, 0.14 mmol), NaOMe (70 μL 5.4 M Lösung, 0.38 mmol) und **45** (70 mg, 0.14 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **69** (64 mg, 0.12 mmol, 87%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Acetonitril/Wasser 6:1).

mp: 210 $^\circ\text{C}$.

$[\alpha]_D = +20.0$ (c 0.3, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ 5.30 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz), 4.73 (m, 1H), 4.56 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, $\text{H-1}'$), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.85 (dd, 1H, $J = 1.9, 12.4$ Hz), 3.81-3.78 (m, 1H), 3.76-3.72 (m, 2H), 3.71-3.65 (m, 3H), 3.62 (dd, 1H, $J = 3.9, 9.7$ Hz), 3.57-3.53 (m, 2H), 3.50 (dd, 1H, $J = 3.9, 9.9$ Hz), 3.44-3.36 (m, 3H), 3.39 (s, 3H, OCH_3), 3.27 (dd, 1H, $J = 8.6, 9.8$ Hz), 3.16 (dd, 1H, $J = 2.5, 14.3$ Hz, H-6_a), 2.89 (dd, 1H, $J = 8.1, 14.3$ Hz, H-6_b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ 102.19 ($\text{C-1}'$), 101.80 (C-1), 88.88 (C-1), 82.63, 82.21, 80.00, 75.27, 74.55, 74.48, 74.12, 72.67, 72.28, 72.20, 63.69 (CH_2), 63.14 (CH_2), 58.07 (OCH_3), 34.04 (C-6).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_{15}\text{SNa}$: 557.2; gef. 557.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Chemische Synthese von Methyl-*S*-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-*O*-[α-D-glucopyranosyl-(1→3)]-6-thio-α-D-glucopyranosid (70)

Vorschrift B mit **66** (36 mg, 0.10 mmol), NaOMe (50 µL 5.4 M Lösung, 0.27 mmol) und **45** (50 mg, 0.10 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **70** (48 mg, 0.09 mmol, 91%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Acetonitril/Wasser 6:1).

mp: 200 °C.

$[\alpha]_D = +90.8$ (c 0.4, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.30 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-1'), 4.73 (m, 1H), 4.51 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H-1'), 3.95-3.91 (m, 1H), 3.92 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H-1), 3.84-3.78 (m, 1H), 3.75 (d, 1H, J = 3.2 Hz), 3.75-3.47 (m, 11H), 3.41-3.36 (m, 1H), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (dd, 1H, J = 2.5, 14.2 Hz, H-6_a), 2.90 (dd, 1H, J = 8.0, 14.2 Hz, H-6_b).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ 102.20 (C-1'), 101.81 (C-1), 89.40 (C-1'), 82.20, 81.73, 76.73, 74.56, 74.49, 74.08, 72.68, 72.61, 72.21, 71.64, 63.93 (CH₂), 63.15 (CH₂), 58.10 (OCH₃), 34.11 (C-6).

ESI MS: m/z: ber. für C₁₉H₃₄O₁₅SN_a: 557.2; gef. 557.2 [M+Na]⁺.

Chemische Synthese von Methyl *S*-((5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α- D-galacto-2-nonulopyranosyl)uronsäure-(2→6)-*O*-[α-D-glucopyranosyl-(1→3)]-6-thio-α-D-glucopyranosid (72)

Vorschrift B mit **71** (13 mg, 0.026 mmol), NaOMe (40 µL 5.4 M Lösung, 0.22 mmol) und **45** (13 mg, 0.026 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **72** (8 mg, 0.012 mmol, 47%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Acetonitril/Wasser 6:1).

mp: 185 °C.

$[\alpha]_D = +76.0$ (c 0.2, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ 5.75 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz), 5.48 (dd, 1H, $J = 3.8, 15.4$ Hz), 5.31 (m, 3H), 5.22 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 4.96 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 4.06-3.87 (m, 3H), 3.85-3.57 (m, 9H), 3.54-3.47 (m, 2H), 3.46-3.29 (m, 6H), 2.17 (s, 3H, CH_3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{NO}_{18}\text{SNa}_3$: 731.2; gef.: 731.3 $[\text{M}+3\text{Na}]^+$.

11.1.4 Synthese der S-(1,6)-verknüpften Allyl-Glykoside

Chemische Synthese von Allyl-S- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-thio- α -D-glucopyranosid (**73**)

Vorschrift B mit **68** (33 mg, 0.09 mmol), NaOMe (46 μL 5.4 M Lösung, 0.25 mmol) und **47** (48 mg, 0.09 mmol) lieferte nach Rühren über 7.5 h **73** (45 mg, 0.08 mmol, 90%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Acetonitril/Wasser 6:1).

mp: 190 $^\circ\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}} = +78.8$ (c 0.2, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ 5.98 (ddd, 1H, $J = 17.3, 10.5, 5.5$ Hz, H_b), 5.38 (dq, 1H, $J = 1.5, 17.3$ Hz, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.33 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, $\text{H-1}'$), 5.26 (dq, 1H, $J = 1.1, 10.5$ Hz, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.90 (d, $J = 3.8$ Hz, H-1), 4.59 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, $\text{H-1}'$), 4.27 (ddt, 1H, $J = 1.5, 5.5, 12.8$ Hz, H_{a1}), 4.07 (ddt, 1H, $J = 1.1, 6.3, 12.8$ Hz, H_{a2}), 3.97 (ddd, 1H, $J = 2.3, 4.6, 10.0$ Hz), 3.88 (ddd, 1H, $J = 2.3, 5.4, 8.5$ Hz), 3.81 (m, 2H), 3.70 (m, 5H), 3.59 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz), 3.53 (dd, 1H, $J = 3.9, 9.9$ Hz), 3.42 (m, 4H), 3.30 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J = 2.5, 14.2$ Hz, H-6a), 2.92 (dd, 1H, $J = 8.0, 14.2$ Hz, H-6b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O): δ 136.19 (C_b), 121.19 (C_c), 101.77 ($\text{C-1}'$), 99.91 (C-1), 88.65 ($\text{C-1}'$), 82.59, 82.21, 79.91, 75.59, 75.23, 74.51 (2C), 74.43, 74.36, 72.59, 72.26, 72.18, 71.17 (C_a), 63.66 (CH_2), 63.13 (CH_2), 33.76 (C-6).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_{15}\text{SNa}$: 583.2; gef. 583.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Allyl α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-S]-O-6-thio- α -D-glucopyranosid (75)

Vorschrift B mit **74** (130 mg, 0.19 mmol), NaOMe (53 μ L 5.4 M Lösung, 0.29 mmol) und **47** (100 mg, 0.19 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **75** (57 mg, 0.08 mmol, 58%) als hellgelben Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

R_f = 0.11 (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}^6$ 2:1) δ 6.03 (1 H, ddd, J = 17.3, 10.5, 5.8 Hz, H_b), 5.48-5.39 (d, J = 17.3, 1.5 Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.31 (m, 2H), 4.93 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 9.9 Hz, 1 H, $\text{H-1}'$), 4.43 (d, J = 7.7 Hz, 1 H), 4.31 (ddd, J = 12.9, 5.8, 1.5 Hz, 1 H, H_{a1}), 4.11 (dd, J = 12.9, 6.2 Hz, 1 H, H_{a2}), 4.00-3.92 (m, 2H), 3.91-3.83 (m, 2H), 3.83-3.79 (m, 2H), 3.78 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 3.76-3.73 (m, 2H), 3.72-3.68 (m, 2H), 3.66 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.63-3.59 (m, 3H), 3.59-3.52 (m, 3H), 3.51 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 3.43-3.31 (m, 2H), 3.20 (dd, J = 14.1, 2.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 14.1, 8.0 Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}^6$ 2:1) δ 136.72 (C_b), 121.35 (C_c), 105.97 ($\text{C-1}''$), 102.08 ($\text{C-1}'''$), 100.21 (C-1), 88.54 ($\text{C-1}'$), 83.11, 81.63, 81.42, 78.79, 78.36, 75.89, 75.79, 75.58, 75.28, 74.86, 74.81, 74.49, 73.88, 72.93, 72.55, 71.51 (20 C, CH), 71.20 (C_a), 63.97 (CH_2), 63.51 (CH_2), 63.26 (CH_2), 33.91 (C-6).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_{20}\text{SNa}$: 745.7; gef. 745.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Allyl α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-S-6-thio- α -D-N-acetyl-glucopyranosid (77)

Vorschrift B mit **68** (88 mg, 0.24 mmol), NaOMe (53 μ L 5.4 M Lösung, 0.29 mmol) und **76** (100 mg, 0.24 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **77** (49 mg, 0.11 mmol, 47%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 6.00 (dddd, J = 17.3, 10.5, 6.2, 5.2 Hz, 1H, H_b), 5.39 (dd, J = 17.3, 1.6 Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.30 (dd, J = 10.5, 1.6 Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.93 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.65 (d, J = 9.8 Hz, 1H, $\text{H-1}'$), 4.30 (tdd, J = 13.1, 5.2, 1.6 Hz, 1H, H_{a1}), 4.07 (tdd, J = 13.1,

6.2, 1.6 Hz, 1H, H_{a2}), 3.98 (dd, J = 10.7, 3.7 Hz, 1H, H-2), 3.96-3.90 (m, 2H), 3.77 (t, J = 9.8, 1H, H-2'), 3.75 (dd, J = 11.5, 4.5 Hz, 1H), 3.59-3.41 (m, 4H), 3.36 (dd, J = 9.8, 8.8 Hz, 1H, H-3'), 3.26 (dd, J = 14.1, 2.5 Hz, 1H, H-6_a), 3.01 (dd, J = 14.1, 8.1 Hz, 1H, H-6_b), 2.07 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 177.29 (CO), 136.44 (C_b), 120.94 (C_c), 98.75 (C-1), 88.75 (C-1'), 82.70, 80.04, 75.80, 75.37, 74.77, 73.81, 72.39, 71.32 (C_a), 63.79 (C-6'), 56.52 (C-2), 34.09 (C-6), 23.36 (CH₃).

Allyl α-D-galactopyranosyl-(1→6)-S-6-thio-α-D-N-acetyl-glucopyranosid (78)

Vorschrift B mit **66** (88 mg, 0.24 mmol), NaOMe (53 µL 5.4 M Lösung, 0.29 mmol) und **76** (100 mg, 0.24 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **78** (21 mg, 0.05 mmol, 20%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.00 (dddd, J = 17.3, 10.4, 6.2, 5.2 Hz, 1H, H_b), 5.40 (dd, J = 17.3, 1.6 Hz, 1H, H_{c,trans}), 5.30 (dd, J = 10.4, 1.6 Hz, 1H, H_{c,cis}), 4.93 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.60 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-1'), 4.30 (tdd, J = 13.1, 5.2, 1.6 Hz, 1H, H_{a1}), 4.07 (tdd, J = 13.1, 6.2, 1.6 Hz, 1H, H_{a2}), 4.03-3.92 (m, 3H), 3.84-3.71 (m, 4H), 3.68 (dd, J = 9.5, 3.3 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 3.50 (dd, J = 9.7, 9.0 Hz, 1H), 3.26 (dd, J = 14.2, 2.6 Hz, 1H, H-6_a), 3.02 (dd, J = 14.2, 8.0 Hz, 1H, H-6_b), 2.07 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 177.29 (CO), 136.44 (C_b), 120.89 (C_c), 98.75 (C-1), 89.31 (C-1'), 81.77, 79.24, 76.76, 75.18, 74.71, 73.78, 72.65, 71.67, 71.32 (C_a), 63.97 (C-6'), 56.52 (C-2), 34.15 (C-6), 23.35 (CH₃).

Allyl α-D-fucopyranosyl-(1→6)-S-6-thio-α-D-N-acetyl-glucopyranosid (80)

Vorschrift B mit **79** (84 mg, 0.24 mmol), NaOMe (53 µL 5.4 M Lösung, 0.29 mmol) und **76** (100 mg, 0.24 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **80** (41 mg, 0.10 mmol 40%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc/2-Propanol/Wasser 6:3:1).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 5.99 (dddd, J = 17.3, 10.4, 6.2, 5.2 Hz, 1H, H_b), 5.38 (dd, J = 17.3, 1.5 Hz, 1H, H_{c,trans}), 5.29 (dd, J = 10.4, 1.6 Hz, 1H, H_{c,cis}), 4.92 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1),

4.50 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1'), 4.29 (tdd, $J = 13.1, 5.2, 1.5$ Hz, 1H, H_{a1}), 4.07 (tdd, $J = 13.1, 6.2, 1.6$ Hz, 1H, H_{a2}), 3.98 (dd, $J = 10.7, 3.6$ Hz, 1H, H-2), 3.92-3.84 (m, 1H), 3.83-3.72 (m, 3H), 3.66 (dd, $J = 9.5, 3.4$ Hz, 1H), 3.56 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.53-3.47 (m, 1H), 3.28 (dd, $J = 14.2, 2.4$ Hz, 1H, H-6_a), 2.88 (dd, $J = 14.2, 8.3$ Hz, 1H, H-6_b), 2.06 (s, 3H, NAc) 1.26 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-6').

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 177.29 (CO), 136.43 (C_b), 120.89 (C_c), 98.72 (C-1), 88.32 (C-1'), 77.82, 76.86, 75.75, 74.38, 73.95, 73.73, 72.26, 71.26 (C_a), 56.53 (C-2), 33.80 (C-6), 23.34 (CH₃), 18.59 (C-6').

ESI MS: m/z : ber. für C₂₂H₃₂O₁₃SNa: 583.2; gef. 583.1 [M+Na]⁺.

11.1.5 Synthese der S-(1,3)-verknüpften Allyl-Alloside

Synthese von Allyl α -D-4,6-benzaldehyddimethylacetal-glucopyranosid (**82**)

Zu einer Lösung von Allylglukose **81** (2.7 g, 12.3 mmol) und Benzaldehyddimethylacetal (2.48 g, 0.016 mol) in DMF (40 mL) wurde Camphersulfonsäure (247 mg, 12 mmol) unter N₂-Atmosphäre zugetropft und die Reaktionsmischung 12 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch (*tert*-Butylmethylether) aufgereinigt und das Produkt **82** (3.55 g, 11.5 mmol, 94%) als weißer Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (m, 2H, Aryl-H), 7.35-7.21 (m, 3H, Aryl-H), 5.84 (dddd, $J = 17.2, 10.4, 6.1, 5.5$ Hz, 1H, H_b), 5.43 (s, 1H, H_{benzyl}), 5.24 (qd, $J = 17.2, 1.4$, 1H, H_{c,trans}), 5.15 (dd, $J = 10.4, 1.2$ Hz, 1H, H_{c,cis}), 4.81 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H-1), 4.18 (dd, $J = 10.1, 4.5$ Hz, 1H), 4.14 (ddt, $J = 12.8, 5.5, 1.4$ Hz, 1H, H_{a1}), 3.95 (tdd, $J = 12.8, 6.1, 1.2$ Hz, 1H, H_{a2}), 3.84 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.80-3.69 (m, 1H), 3.62 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H), 3.51 (dt, $J = 9.3, 3.9$ Hz, 1H), 3.38 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 137.01 (Aryl-C_{quart}), 133.32 (C_b), 129.15 (Aryl-C_{quart}), 128.24 (2 Aryl-C), 126.28 (2 Aryl-C), 118.17 (C_c), 101.81 (CH_{benzyl}), 97.87 (C-1), 80.89, 77.43, 77.00, 76.58, 72.70, 71.49, 68.81 (CH₂), 68.76 (CH₂), 62.53 (C-5).

Synthese von an Position 2 bzw. 3 tosylierter Glukosebausteine

Zu einer Lösung von **82** (924 mg, 3.0 mmol) in DMF (10 mL) wurde Natriumhydrid (132 mg, 33 mmol) unter N₂-Atmosphäre gegeben. Nach 10 minütigem Rühren wurde *para*-Tosylchlorid (572 mg, 3.3 mmol) zugegeben und die Reaktion nach 30 Min. durch Zutropfen von 2-Propanol beendet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Dimethylether/Wasser aufgenommen, die wässrige Phase mit Ether extrahiert (2 mal) und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch (*tert*-Butylmethylether/Pentan 3:1) aufgereinigt und zuerst das 2-Tosylat **83** (688 mg, 1.49 mmol, 50%), dann das 3-Tosylat **84** (172 mg, 0.37 mmol, 12%) erhalten. Die Produkte wurden anschließend in 70%iger Essigsäure 3 h bei 70 °C gerührt, das Lösungsmittel entfernt und die entschützten Produkte quantitativ erhalten.

Allyl 2-*O*-*para*-toluolsulfonyl- α -D-glucopyranosid (**85**)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.85-7.81 (m, 2H, Aryl-H), 7.45-7.42 (m, 2H, Aryl-H), 5.84 (dddd, J = 17.2, 10.5, 6.0, 5.2 Hz, 1H, H_b), 5.29 (qd, J = 17.2, 1.7 Hz, 1H, H_{c,trans}), 5.16 (ddd, J = 10.5, 3.1, 1.3 Hz, 1H, H_{c,cis}), 4.85 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.21 (dd, J = 9.7, 3.7 Hz, 1H, H-2), 4.14 (dd, J = 13.0, 5.2 Hz, 1H, H_{a1}), 3.86-3.79 (m, 2H, H-3, H_{a2}), 3.67 (dd, J = 12.0, 5.4 Hz, 1H, H-6_a), 3.57 (ddd, J = 9.9, 5.4, 2.1 Hz, 1H, H-5), 3.37-3.30 (m, 2H, H-4, H-6_b), 2.46 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 146.49 (Aryl-C_{quart}), 135.12 (Aryl-C_{quart}), 134.85 (C_b), 130.90 (2 Aryl-C), 129.08 (2 Aryl-C), 117.79 (C_c), 96.58 (C-1), 81.28 (C-2), 73.56 (C-5), 71.99 (C-3), 71.53 (C-4), 69.31 (C_a), 62.22 (C-6), 21.61 (CH₃).

Allyl 3-*O*-*para*-toluolsulfonyl- α -D-glucopyranosid (**86**)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.83-7.73 (m, 2H, Aryl-H), 7.70-7.66 (m, 2H, Aryl-H), 5.88 (dddd, J = 17.2, 10.4, 6.1, 5.3 Hz, 1H, H_b), 5.31 (qd, J = 17.2, 1.6 Hz, 1H, H_{c,trans}), 5.20 (ddd, J = 10.4, 3.0, 1.3 Hz, 1H, H_{c,cis}), 4.98 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.93 (dd, J = 9.9, 9.0 Hz, 1H, H-3), 4.31 (dd, J = 9.9, 3.5 Hz, 1H, H-2), 4.16 (tdd, J = 12.9, 5.3, 1.6 Hz, 1H, H_{a1}), 3.88 (tdd, J = 12.9, 6.1, 1.3 Hz, 1H, H_{a2}), 3.76 (dd, J = 11.8, 2.0 Hz, 1H, H-6_a), 3.66 (dd, J = 11.8, 4.9 Hz,

¹H, H-6_b), 3.61 (ddd, J = 9.8, 4.9, 2.0 Hz, 1H, H-5), 3.53-3.44 (m, 1H, H-4), 2.46 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 146.87 (Aryl-C_{quart}), 134.69 (C_b), 131.06 (Aryl-C_{quart}), 130.73(2 Aryl-C), 129.36 (2 Aryl-C), 118.28 (C_c), 96.61 (C-1), 81.90 (C-3), 77.58 (C-2), 73.90 (C-5), 69.71 (C_a), 69.63 (C-4), 61.77 (C-6), 21.67 (CH₃).

Allyl β-D-glucopyranosyl-(1→3)-S-3-thio-α-D-allopyranosid (87)

Vorschrift B mit **68** (100 mg, 0.27 mmol), NaOMe (1.4 mL 0.5 M Lösung, 0.7 mmol) und **86** (102 mg, 0.27 mmol) lieferte nach Rühren über 4 h **87** (32 mg, 0.08 mmol, 30%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Acetonitril/Wasser 10:1).

R_f = 0.37 (Acetonitril/Wasser 10:1).

[α]_D = +16.6 (c 1.0, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.00 (ddt, J = 17.3, 10.5, 5.1 Hz, 1H, H_b), 5.43 (dd, J = 1.5, 17.3 Hz, 1H, H_{c,trans}), 5.29 (dd, J = 1.3, 10.5 Hz, H_{c,cis}), 4.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-1), 4.62 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-1'), 4.28 (tdd, J = 13.1, 5.1, 1.5 Hz, 1H, H_{a1}), 4.17 (dd, J = 8.6, 4.4 Hz, 1H), 4.09 (tdd, J = 13.1, 6.1, 1.3 Hz, 1H, H_{a2}), 4.12-4.05 (m, 1H), 4.00-3.86 (m, 3H), 3.84-3.67 (m, 2H), 3.67-3.21 (m, 5H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 136.23 (C_b), 120.77 (C_c), 101.17 (C-1), 88.80 (C-1'), 82.83, 80.02, 75.72, 74.08, 74.02, 72.31, 70.96 (C_a), 67.03, 63.68 (CH₂), 63.56 (CH₂), 51.11 (C-3).

ESI MS: m/z: ber. für C₁₅H₂₆O₁₀SNa: 421.1; gef. 421.1 [M+Na]⁺.

Allyl β-D-galactopyranosyl-(1→3)-S-3-thio-α-D-allopyranosid 88

Vorschrift B mit **66** (100 mg, 0.27 mmol), NaOMe (1.4 mL 0.5 M Lösung, 0.7 mmol) und **86** (70 mg, 0.19 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht **88** (26 mg, 0.07 mmol, 34%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc/2-Propanol/Wasser 12:6:1).

R_f = 0.42 (EtOAc/2-Propanol/Wasser 12:6:1).

[α]_D = +4.0 (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 Mhz, D_2O) δ 5.99 (ddd, $J = 17.2, 10.6, 5.1$ Hz, 1H, H_b), 5.42 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.29 (dd, $J = 10.6$, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.81 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-1), 4.56 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-1'), 4.27 (ddt, $J = 13.0, 5.1, 1.5$ Hz, 1H, H_{a1}), 4.16 (dd, $J = 8.4, 4.4$ Hz, 1H, H-4), 4.11 (dd, $J = 2.6, 4.8$ Hz, 1H, H-2), 4.12-4.08 (m, 1H, H_{a2}), 3.98 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4'), 3.96-3.85 (m, 2H, H-5', H-6_a), 3.84-3.54 (m, 7H, H-6b, H-6', H-5, H-3', H-3, H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 136.21 (C_b), 120.87 (C_c), 101.21 (C-1), 89.31 (C-1'), 81.99 (C-5), 76.73 (C-3'), 74.18 (C-5'), 74.08 (C-2), 73.10 (C-2'), 71.67 (C-4'), 71.01 (C_a), 67.13 (C-4), 64.04 (C-6'), 63.54 (C-6), 51.25 (C-3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_{10}\text{SNa}$: 421.1; gef. 421.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Allyl α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-S-3-thio- α -D-allopyranosid (90)

Vorschrift B mit **89** (100 mg, 0.25 mmol), NaOMe (1.4 mL 0.5 M Lösung, 0.7 mmol) und **86** (92 mg, 0.25 mmol) lieferte nach Rühren über 4.5 h **90** (21 mg, 0.05 mmol, 21%) als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Acetonitril/Wasser 12:1).

$R_f = 0.35$ (Acetonitril/Wasser 10:1).

$[\alpha]_D = +60.6$ (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 Mhz, D_2O) δ 6.00 (dddd, $J = 17.1, 10.5, 6.2, 5.3$ Hz, 1H, H_b), 5.41 (dd, $J = 17.1, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.41 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-1') 5.30 (dd, $J = 10.5, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.81 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, H-1), 4.31 (dd, $J = 13.0, 5.3$ Hz, 1H, H_{a1}), 4.14 (ddd, $J = 13.0, 6.2, 1.6$ Hz, 1H, H_{a2}), 4.10 (dd, $J = 6.5, 4.4$ Hz, 1H), 4.06-3.99 (m, 1H), 3.98-3.26 (m, 10 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 Mhz, D_2O) δ 136.27 (C_b), 121.10 (C_c), 102.15 (C-1), 88.87 (C-1'), 76.36, 75.23, 74.53, 73.81, 73.77, 71.76 (C_a), 69.84, 68.94, 63.58(CH_2), 63.25 (CH_2), 53.11 (C-3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_{10}\text{SNa}$: 421.1; gef. 421.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

**Allyl β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-S-3-thio- α -D-allopyranosid
91**

Vorschrift B mit **74** (60 mg, 0.09 mmol), NaOMe (1.4 mL 0.5 M Lösung, 0.7 mmol) und **86** (32 mg, 0.09 mmol) lieferte nach Rühren über Nacht (8 mg, 0.01 mmol, 13%) **91** als weißen Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Acetonitril/Wasser 10:1).

$R_f = 0.28$ (Acetonitril/Wasser 10:1).

$[\alpha]_D = +9.2$ (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 Mhz, D_2O) δ 6.02 (dddd, $J = 17.3, 10.5, 6.1, 5.1$ Hz, 1H, H_b), 5.44 (dd, $J = 17.3, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.31 (dd, $J = 10.5, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.83 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-1), 4.67 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, $\text{H-1}''$), 4.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, $\text{H-1}'$), 4.29 (dd, $J = 13.1, 5.1$ Hz, 1H, H_{a1}), 4.19 (dd, $J = 8.5, 4.4$ Hz, 1H), 4.15-4.07 (m, 1H, H_{a2}), 4.02 (dd, $J = 12.4, 2.0$ Hz, 1H), 3.99-3.54 (m, 15H), 3.41 (dd, $J = 9.9, 8.8$ Hz, 1H).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_{15}\text{SNa}$: 583.2; gef. 583.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

12 Anbindung funktionalisierter Linker

12.1 Synthese der säurefunktionalisierten Glukosederivate

3-[[3-(α -D-glucopyranosyl)oxy]propyl]thiopropionsäure **92**

81 (30 mg, 0.14 mmol) und 3-Mercaptopropionsäure (12 μ L, 1 Äquiv.) wurden in Wasser (1,5 mL) gelöst und mit UV-Licht (254 nm, 350W) bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und **92** als Feststoff (30 mg, 0.10 mmol, 66%) erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.92 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-1), 3.87 (dd, J = 12.3, 2.3 Hz, 1H), 3.87-3.82 (m, 1H), 3.81-3.72 (m, 1H), 3.73-3.66 (m, 2H), 3.61 (dd, J = 10.0, 5.8 Hz, 1H), 3.56 (dd, J = 9.8, 3.8 Hz, 1H, H-2), 3.42 (dd, J = 9.8, 9.1 Hz, 1H), 2.87-2.81 (m, 2H, H_d), 2.79-2.69 (m, 4H, H_c , H_e), 2.04-1.85 (m, 2H, H_b).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 179.53 (CO), 101.00 (C-1), 75.98 (CH), 74.65 (CH), 74.19 (CH), 72.40 (CH), 69.30 (C_a), 63.36 (C-6), 37.02 (C_e), 31.38 (CH_2), 30.82 (CH_2), 28.99 (CH_2).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{SNa}$: 349.1; gef. 349.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6-[[3-(α -D-glucopyranosyl)oxy]propyl]thiohexansäure **93**

81 (60 mg, 0.27 mmol) und 6-Mercaptohexansäure (41.5 μ L, 1.1 Äquiv.) wurden in Dimethylformamid (3 mL) gelöst und unter Rühren 5 h mit UV-Licht (254 nm, 350 W) bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und **93** als Feststoff (45 mg, 0.12 mmol, 45%) erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.80 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.84-3.79 (m, 1H), 3.74-3.61 (m, 2H), 3.61-3.54 (m, 1H), 3.51 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.41 (dd, J = 9.7, 3.8 Hz, 1H, H-2), 3.35-3.24 (m, 1H), 2.65 (dt, J = 7.5, 7.3, 1.9 Hz, 2H, H_c), 2.55 (dt, J = 7.5, 7.3, 2.4 Hz, 2H, H_d), 2.35 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H_h), 2.03-1.80 (m, 2H, H_b), 1.72-1.54 (m, 4H, H_e , H_g), 1.51-1.36 (m, 2H, H_f).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.95 (CO), 100.15 (C-1), 75.12 (CH), 73.66 (CH), 73.55 (CH), 71.72 (CH), 67.56 (OCH_2), 62.61 (C-6), 34.69 (CH_2), 32.57 (CH_2), 30.64 (CH_2), 30.35 (CH_2), 29.57 (CH_2), 29.29 (CH_2), 25.61 (CH_2).

ESI-MS: m/z: ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{S}$: 367.4; gef. 367.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

11-[[3-(α -D-glucopyranosyl)oxy]propyl]thioundecansäure **94**

81 (40 mg, 0.18 mmol) und 11-Mercaptoundecansäure (40 mg, 1.0 Äquiv.) wurden in Dimethylformamid (3 mL) gelöst und unter Rühren 6 h mit UV-Licht (254 nm, 350 W) bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und **94** als Feststoff (32 mg, 0.07 mmol, 41%) erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.86 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 3.82 (dd, J = 11.8, 2.4 Hz, 1H), 3.73-3.63 (m, 2H), 3.63-3.54 (m, 1H), 3.43 (dd, J = 9.7, 3.7 Hz, 1H, H-2), 3.36-3.31 (m, 2H), 3.21-3.11 (m, 1H), 3.11-2.99 (m, 2H), 2.98-2.56 (m, 8H), 2.30 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.92-1.72 (m, 2H), 1.70-1.54 (m, 10H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 177.64 (CO), 99.18 (C-1), 75.10 (CH), 73.79 (CH), 73.53 (CH), 71.82 (CH), 69.28 (C_a), 62.66 (C-6), 34.96 (CH_2), 30.52 (CH_2), 30.47 (CH_2), 30.39 (CH_2), 30.37 (CH_2), 30.24 (CH_2), 30.20 (CH_2), 30.15 (CH_2), 29.83 (CH_2), 26.10 (CH_2), 26.08 (CH_2), 26.03 (CH_2).

ESI-MS: m/z: ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{S}$: 433.5; gefunden: 433.3 $[\text{M}-5\text{H}]^{5-}$.

16-[[3-(α -D-glucopyranosyl)oxy]propyl]thiohexadecansäure **95**

81 (40 mg, 0.18 mmol) und 16-Mercaptohexadecansäure (58 mg, 1.1 Äquiv.) wurden in Dimethylformamid (3 mL) gelöst und unter Rühren 5 h mit UV-Licht (254 nm, 350 W) bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und **95** als Feststoff (35 mg, 0.07 mmol, 38%) erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.85 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 3.82 (dd, J = 11.8, 2.4 Hz, 1H), 3.72-3.65 (m, 2H), 3.60 (ddd, J = 9.9, 5.5, 2.4 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 9.7, 3.8 Hz, 1H), 3.33 (td, J = 3.3, 1.7 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.69-1.53 (m, 2H), 1.39-1.25 (m, 31H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 177.61 (CO), 99.18 (C-1), 75.66 (CH), 74.35 (CH), 74.10 (CH), 72.40 (CH), 69.83 (C_a), 63.25 (C-6), 35.53 (2 x CH_2), 32.25 (2 x CH_2), 31.33 (2 x CH_2), 31.29 (2 x CH_2), 31.28 (2 x CH_2), 31.17 (CH_2), 31.02 (CH_2), 30.99 (CH_2), 30.80 (CH_2), 30.43 (CH_2), 26.67 (CH_2), 26.62 (CH_2).

ESI-MS: m/z: ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{O}_8\text{S}$: 507.7; gef. 507.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

12.2 Synthese der aminofunktionalisierten Kohlenhydrate: Allgemeine Vorschrift C

Allylzucker (1 Äquiv.) und Cysteamin (1 bzw. 4 Äquiv.) wurden in Wasser gelöst und mit UV-Licht (254 nm, 350W) bestrahlt. Die Reaktionsmischung wurde auf eine Dowex 50 W x 2 (H^+) Säule gegeben. Nach Eluieren mit Wasser, wurde das Produkt mit wässriger Ammoniaklösung (6%) eluiert und das Wasser anschließend durch Gefriertrocknung entfernt.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-glucopyranosid (**97**)

Vorschrift C mit **81** (40 mg, 0.18 mmol) und Cysteamin (21 mg, 1 Äquiv.) lieferte nach 5 h **97** als weißen Feststoff (21 mg, 0.07 mmol, 39%).

R_f = 0.42 (EtOAc/AcOH/Wasser 3:2:1).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.91 (d, 1H, J = 3.8 Hz, H-1), 3.85 (dd, 1H, J = 12.1, 2.2 Hz), 3.86-3.79 (m, 1H), 3.75 (dd, 1H, J = 17.6, 5.3 Hz), 3.71-3.65 (m, 2H), 3.60 (m, 1H), 3.55 (dd, 1H, J = 9.8, 3.8 Hz, H-2), 3.40 (dd, 1H, J = 9.9, 9.1 Hz), 3.03 (t, 2H, J = 6.6 Hz, H_e), 2.77 (t, 2H, J = 6.6 Hz, H_d), 2.69 (dt, 2H, J = 7.3, 2.1 Hz, H_c), 2.00-1.85 (m, 2H, H_b).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 100.94 (C-1), 75.93, 74.66, 74.11, 72.37, 69.21 (C_a), 63.35 (C-6), 41.79 (C_e), 33.67 (C_d), 31.33 (C_c), 30.35 (C_b).

ESI MS: m/z: ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{SNa}$: 326.4; gef. 320.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-N-acetyl-glucopyranosid (**99**)

Vorschrift C mit **98** (40 mg, 0.18 mmol) und Cysteamin (18 mg, 1 Äquiv.) lieferte nach 80 Min. **99** als weißen Feststoff (25 mg, 0.07 mmol, 49%).

R_f = 0.37 (EtOAc/AcOH/Wasser 3:2:1).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.86 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H-1), 3.91 (dd, 1H, $J = 3.6, 10.7$ Hz), 3.87-3.54 (m, 6H), 3.49 (d, 1H, $J = 9.0, 9.9$ Hz, 6H), 2.94 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H_e), 2.71 (m, 4H, H_c , H_d), 2.05 (s, 3H, CH_3) 1.91 (m, 2H, H_b).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 178.96, 101.46 (C-1), 76.49, 75.57, 74.59, 70.98 (C_a), 65.14 (C-6), 58.36 (C-2), 43.91 (C_e), 36.73 (C_d), 33.01 (C_c), 32.20 (C_b), 26.48 (CH_3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{SNa}$: 361.4; gef. 361.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-galactopyranosid (101)

Vorschrift C mit **100** (40 mg, 0.18 mmol) und Cysteamin (21 mg, 1 Äquiv.) lieferte nach 70 Min. **101** als weißen Feststoff (33 mg, 0.11 mmol, 62%).

$R_f = 0.39$ (EtOAc/AcOH/Wasser 3:2:1)

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.94 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, H-1), 3.99-3.92 (m, 2H), 3.87-3.78 (m, 3H), 3.74 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz), 3.61-3.52 (m, 1H), 3.06 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H_e), 2.79 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H_d), 2.73-2.63 (m, 2H, H_c), 1.93 (m, 2H, H_b).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 101.14 (C-1), 73.77, 72.33, 72.06, 71.09, 69.32 (C_a), 64.00 (C-6), 41.66 (C_e), 33.15 (C_d), 31.34 (C_c), 30.34 (C_b).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{SNa}$: 326.4; gef. 320.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-mannopyranosid (103)

Vorschrift C mit **102** (40 mg, 0.18 mmol) und Cysteamin (21 mg, 1 Äquiv.) lieferte nach 70 Min. **103** als weißen Feststoff (22 mg, 0.07 mmol, 31%).

$R_f = 0.43$ (EtOAc/AcOH/Wasser 3:2:1).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.86 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H-1), 3.94 (dd, 1H, $J = 1.6, 3.4$ Hz), 3.90 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz), 3.55-3.85 (m, 6H), 2.96 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H_e), 2.74 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H_d), 2.67 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, H_c), 1.91 (m, 2H, H_b).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 102.55 (C-1), 75.61 (C-5), 73.41, 72.86, 69.55, 68.95 (C_a), 63.74 (C-6), 41.98 (C_e), 34.55 (C_d), 31.29 (C_c), 30.37 (C_b).

ESI MS: m/z: ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{SNa}$: 326.4; gef. 320.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-S-6-thio- α -D-N-acetyl-glucopyranosid 104

Vorschrift C mit **77** (40 mg, 0.09 mmol) und Cysteamin (43 mg, 4 Äquiv.) lieferte nach 90 Min. **104** als weißen Feststoff (21 mg, 0.04 mmol, 45%).

R_f = 0.29 (EtOAc/AcOH/Wasser).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.86 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.64 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-1'), 3.93-3.41 (m, 9H), 3.34 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H_a), 3.24 (dd, J = 14.1, 2.5 Hz, 1H), 2.96 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H_e), 2.76-2.67 (m, 6H, H_d , H_c , H-6), 2.05 (s, 3H, CH_3), 1.93 (m, 2H, H_b).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 177.17 (CO), 99.62 (C-1), 88.61 (C-1'), 82.68, 79.99, 75.74, 75.36, 74.75, 73.70, 72.37, 69.38 (C_a), 63.77 (C-6'), 56.57 (C-2), 40.35 (C_e), 34.73 (C_d), 33.93 (C-6), 31.21 (C_c), 30.50 (C_b), 24.71 (CH_3).

ESI MS: m/z: ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Na}$: 539.2; gef. 539.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-S-6-thio- α -D-N-acetyl-glucopyranosid (105)

Vorschrift C mit **78** (17 mg, 0.04 mmol) und Cysteamin (18 mg, 4 Äquiv.) lieferte nach 90 Min. **105** als weißen Feststoff (10 mg, 0.02 mmol, 49%).

R_f 0.34 (EtOAc/AcOH/Wasser).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.88 (d, J = 3.87 Hz, 1H, H-1), 4.62 (d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1'), 4.01 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 3.7, 10.6 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 6.0, 10.2 Hz, 1H), 3.81-3.73 (m, 3H), 3.76 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 3.70 (dd, J = 3.4, 9.5 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 3.6 Hz, 2H), 3.50 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.26 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H_a), 3.26 (m, 1H), 2.88 (m, 4H, H_e , H_d), 2.75 (t, 2H, H_c), 2.08 (s, 3H, CH_3), 1.96 (m, 2H, H_b).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 177.26 (CO), 99.67 (C-1), 88.16 (C-1'), 81.78, 76.73, 75.76, 74.66, 73.72, 72.70, 71.70, 69.34 (Ca), 64.01 (C-6'), 56.61 (C-2), 41.30 (C_e), 34.02 (C_d), 31.01 (C-6), 30.63 (C_c), 30.44 (C_b), 24.85 (CH_3).

ESI MS: m/z: ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Na}$: 539.2; gef. 539.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-S-6-thio- α -D-N-acetyl-glucopyranosid (106)

Vorschrift C mit **80** (32 mg, 0.08 mmol) und Cysteamin (34 mg, 4 Äquiv.) lieferte nach 2 h **106** als weißen Feststoff (18 mg, 0.04 mmol, 48%).

R_f 0.35 (EtOAc/AcOH/Wasser).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.86 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-1), 4.50 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1'), 3.99-3.84 (m, 3H), 3.83-3.61 (m, 4H), 3.60-3.42 (m, 2H), 3.34 (t, $J = 6.5$, 6.5 Hz, 2H, H_a), 3.18 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H_e), 3.10 (t, $J = 6.5$, 2H, H_d), 2.96-2.80 (m, 2H, H_c), 2.05 (s, 3H, NAc), 1.97-1.87 (m, 2H, H_b), 1.25 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 177.18 (CO), 99.60 (C-1), 88.35 (C-1'), 81.78, 76.73, 75.76, 74.66, 73.72, 72.70, 71.70, 69.34 (Ca), 64.01 (C-6'), 56.61 (C-2), 41.30 (C_e), 34.02 (C_d), 31.01 (C-6), 30.63 (C_c), 30.44 (C_b), 24.85 (CH_3).

ESI MS: m/z: ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2\text{Na}$: 523.2; gef. 523.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D- galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-S]-O-6-thio- α -D-glucopyranosid (107)

Vorschrift C mit **75** (47 mg, 0.065 mmol) und Cysteamin (31 mg, 4 Äquiv.) lieferte nach 90 Min. **107** als weißen Feststoff (13 mg, 0.016 mmol, 25%).

R_f 0.13 (EtOAc/AcOH/Wasser).

ESI MS: m/z: ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{NO}_{20}\text{S}_2\text{Na}$: 822.3; gef. 822.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-(2-Aminoethylthio)propyl β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-3-thio- α -D-allopyranosid (108)

Vorschrift C mit **87** (12 mg, 0.030 mmol) und Cysteamin (14 mg, 4 Äquiv.) lieferte nach 90 Min. **108** als weißen Feststoff (8 mg, 0.017 mmol, 56%).

R_f 0.52 (EtOAc/AcOH/Wasser).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.62 (d, J = 9.9 Hz, H-1'), 4.17 (dd, J = 8.8, 4.3 Hz, 1H), 4.10 (td, J = 4.1, 2.1 Hz, 1H), 3.99-3.77 (m, 3H), 3.73 (dd, J = 12.5, 5.6 Hz, 1H), 3.65-3.54 (m, 3H), 3.55-3.38 (m, 3H), 3.38-3.30 (m, 2H, H_a), 3.11-2.97 (m, 2H, H_e), 2.96-2.80 (m, 2H, H_d), 2.78-2.67 (m, 2H, H_c), 1.97-1.90 (m, 2H, H_b).

ESI MS: m/z: ber. für C₁₇H₃₄NO₁₀S₂: 476.2; gef. 476.1 [M+H]⁺.

3-(2-Aminoethylthio)propyl O-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)uronsäure-(2 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosid (110)

Vorschrift C mit **109** (38 mg, 0.07 mmol) und Cysteamin (32 mg, 4 Äquiv.) lieferte nach 2.5 h **110** als weißen Feststoff (27 mg, 0.04 mmol, 62%).

R_f 0.26 (EtOAc/AcOH/Wasser).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.93 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.17 (dd, J = 10.9, 3.8 Hz, 1H), 4.14-4.07 (m, 1H), 4.06-3.99 (m, 1H), 3.99-3.85 (m, 2H), 3.85-3.77 (m, 5H), 3.74-3.51 (m, 5H), 3.34 (t, J = 6.5, 2H, H_a), 3.22 (t, J = 6.5, 2H, H_e), 3.15 (t, J = 6.5, 2H, H_d), 2.97-2.83 (m, 2H, H_c), 2.09-2.02 (m, 2H, H_b), 1.92 (d, 6H, 2 NAc).

ESI MS: m/z: ber. für C₂₄H₄₄N₃O₁₄S: 630.3; gef. 630.1 [M+H]⁺.

13 Versuche Mikroarrays

13.1 Versuche mit säurefunktionalisierten Zuckern

a) Mikrotiterplatte

92 (7.2 mg, 0.02 mmol) wurde in qH₂O (1 mL) gelöst. Jeweils 100 µL dieser Lösung wurden in die Wells A1-D2 einer 96-well Mikrotiterplatte der Firma *Nunc* gegeben. EDAC (28 mg, 0.15 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (6 mg, 0.05 mmol) wurden in qH₂O gelöst und jeweils 100 µL dieser Lösung in die Wells A1-E2 gegeben und 13 h inkubiert. Die Wells wurden mit qH₂O gewaschen (3 x 5 Min.) und BSA-Blockingpuffer (BSA (250 mg), MnCl₂·4H₂O (10 mg), CaCl₂·2H₂O (7 mg) in PBS-Puffer (50 mL); jeweils 200 µL pro well) in die Wells A1-H2 gegeben. Nach 1 h wurde mit qH₂O gewaschen (3 x 5 Min.). Es wurde Concanavalin A (20 µg/mL, jeweils 200 µL pro Well) in die Wells A1-B2 und E1-F2 gegeben. Nach 1 h wurde mit qH₂O gewaschen (3 x 5 Min.). Anschließend wurde die Fluoreszenz mit dem Scanner Sunrise der Firma *Tecan* bei einer Extinktion von 535 nm und einer Anregung bei 485 nm gemessen.

b) Mikroarrays

Versuch a)

Ein aminofunktionalisiertes Glasslide (*Genetix*, Bestellnummer K2615, England) wurde in eine Lösung von 3-MPA (24 µL, 0.28 mmol), EDAC (175 mg) und NHS (37 mg) in qH₂O (25 mL) 24 h eingetaucht. Anschließend wurde mit qH₂O gewaschen und getrocknet. Auf dem Array wurden Lösungen von **81**, **98**, **46** und **38** in qH₂O/Glycerol (1:1) in 3 Konzentrationen (2 mM, 0.9 mM, 0.5 mM) gespottet. Das Slide wurde 2 h mit UV- Licht (254 nm, 6 W) bestrahlt und anschließend mit qH₂O gewaschen. Das Slide wurde 15 Min. mit *N*-Ethylmaleimid-Lösung (1% in PBS) geblockt und anschließend mit PBS/Tween 20 (0.1%) und qH₂O (2 mal) gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (3% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS (20 µg/mL) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS und qH₂O wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch b)

Ein aminofunktionalisiertes Glasslide (*ArrayIt*, Super Amine 2, Bestellnummer SMM2F, USA) wurde in eine Lösung von 3-MPA (24 μL , 0.28 mmol), EDAC (175 mg, 0.91 mmol, 3.25 Äquiv.) und NHS (37 mg, 0.32 mmol, 1.14 Äquiv.) in qH_2O (25 mL) 24 h eingetaucht. Anschließend wurde mit qH_2O gewaschen und unter N_2 getrocknet. Auf dem Array wurden Lösungen von **81** in qH_2O /Glycerol (7:3) in sieben Konzentrationen (10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 0.1 mM) gespottet. Das Slide wurde über Nacht mit UV-Licht (254 nm, 6 W) bestrahlt und anschließend mit qH_2O gewaschen. Das Slide wurde 15 Min. mit *N*-Ethylmaleimid-Lösung (1% in PBS) geblockt und anschließend mit PBS/Tween 20 (0.1%) und qH_2O (2 mal) gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (3% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS in sieben Konzentrationen (200, 150, 100, 75, 50, 25, 12 $\mu\text{g/mL}$) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS und qH_2O wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch c)

Ein aminofunktionalisiertes Glasslide (*ArrayIt*, Super Amine 2, Bestellnummer SMM2F, USA) wurde in eine Lösung von 3-MPA (24 μL , 0.028 mmol), EDAC (175 mg, 0.91 mmol, 3.25 Äquiv.) und NHS (37 mg, 0.32 mmol, 1.14 Äquiv.) in qH_2O (25 mL) 24 h eingetaucht. Anschließend wurde mit qH_2O gewaschen und unter N_2 getrocknet. Auf dem Array wurden Lösungen von **98** in qH_2O /Glycerol (7:3) in sieben Konzentrationen (10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 0.1 mM) gespottet. Das Slide wurde über Nacht mit UV- Licht (254 nm, 6 W) bestrahlt und anschließend mit qH_2O gewaschen. Das Slide wurde 15 Min. mit *N*-Ethylmaleimid-Lösung (1% in PBS) geblockt und anschließend mit PBS/Tween 20 (0.1%) und qH_2O (2 mal) gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (3% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS in sieben Konzentrationen (200, 150, 100, 75, 50, 25 und 12 $\mu\text{g/mL}$) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS und qH_2O wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch d)

Auf ein aminofunktionalisiertes Glasslide (*ArrayIt*, Super Amine 2, Bestellnummer SMM2F, USA) wurden Lösungen von **92**, **93**, **94** und **95** (jeweils 1 mM) in qH₂O/Glycerol (7:3) mit EDAC/NHS (jeweils 250 µg/mL) gespottet und über Nacht reagieren gelassen. Das Slide wurde 15 Min. mit *N*-Ethylmaleimid-Lösung (1% in PBS) geblockt und anschließend mit PBS/Tween 20 (0.1%) und qH₂O (2 mal) gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (3% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS (20 µg/mL) mit CaCl₂/MnCl₂ (jeweils 1 mM) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS und qH₂O und Trocknen unter N₂ wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch e)

Ein aminofunktionalisiertes Glasslide (*ArrayIt*, Super Amine 2, Bestellnummer SMM2F, USA) wurde zunächst mit 4 verschiedenen thiofunktionalisierten Linkern (3-MPA, 6-MHA, 11-MUDA und 16-MHDA, jeweils 8 mM) unter Zugabe von EDAC/NHS (jeweils 250 µg/mL) funktionalisiert. Anschließend wurden Lösungen von **98** und Pentenyl α -D-glucopyranosid in qH₂O/Glycerol (7:3) in vier Konzentrationen (4, 2, 1, 0.5 mM) gespottet und über Nacht unter UV-Bestrahlung (6 W) reagieren gelassen. Das Slide wurde 15 Min. mit *N*-Ethylmaleimid-Lösung (1% in PBS) geblockt und anschließend mit PBS/Tween 20 (0.1%) und qH₂O (2 mal) gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (3% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS (20 µg/mL) mit CaCl₂/MnCl₂ (jeweils 1 mM) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS und qH₂O und Trocknen unter N₂ wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch f)

Auf dem je einem Slide (*Greiner Bio-One*, Modell HTA Slide 1, 3-D Amino, Bestellnummer 445835, Deutschland und *ArrayIt*, Super Amine 2, Bestellnummer SMM2F, USA) wurden Lösungen von **92** in qH₂O/Glycerol (8:2) mit EDAC/NHS (jeweils 250 µg/mL) in vier

Konzentrationen (4, 2, 1, 0.5 mM) gespottet und 3 h reagieren gelassen. Das Slide wurden 15 Min. mit *N*-Ethylmaleimid-Lösung (1% in PBS) geblockt und anschließend mit PBS/Tween 20 (0.1%) und qH₂O (2 mal) gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (3% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde Alexa-Fluor- und FITC-ConA in PBS (20 µg/mL) mit CaCl₂/MnCl₂ (jeweils 1 mM) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS und qH₂O und Trocknen unter N₂ wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch g)

Auf einem Epoxid-funktionalisiertem Slide (*Schott*, Slide E, Bestellnummer 39-1117570, Deutschland) wurden Lösungen von N-Acetylglukosamin und Glukose **38** in qH₂O/Glycerol (8:2) in vier Konzentrationen (4, 2, 1, 0.5 mM) gespottet und über Nacht reagieren gelassen. Das Slide wurde 30 Min. mit Ethanolamin-Lösung (3% in 10 mM NaHCO₃) geblockt und anschließend mit qH₂O gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (1% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS (80, 40 und 20 µg/mL) mit CaCl₂/MnCl₂ (jeweils 1 mM) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS/Tween 20, qH₂O und Trocknen unter N₂ wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch h)

Fluorescein-5EX-succinimidylester (*Sigma Aldrich*, Deutschland) wurde in Puffer (0.1 M Na₂CO₃/DMF/Glycerol 3:3:2) gelöst und auf ein Slide der Firma *ArrayIt* (Super Amine 2 Bestellnummer SMM2F, USA) in zwei Konzentrationen (2.2 mg/mL und 4.4 mg/mL) gespottet. Nach 1 h wurde mit qH₂O, Ethanol und qH₂O gewaschen, unter N₂ getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch i)

92 wurde in Puffer (0.1 M Na₂CO₃ mit 25% Glycerol) und Zugabe von EDAC/NHS (5 mg/mL) in vier Konzentrationen (4, 2, 1, 0.5 mM) auf ein Slide (*ArrayIt*, Super Amine 2,

Bestellnummer SMM2F, USA) gespottet. Nach 16 h wurde mit Puffer und qH₂O gewaschen. Das Slide wurde 15 Min. mit *N*-Ethylmaleimid-Lösung (1% in PBS) geblockt und anschließend mit PBS/Tween 20 (0.1%) und qH₂O (2 mal) gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (3% in PBS mit 0.2% Tween 20) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 (0.1%) gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS (20 µg/mL) mit CaCl₂/MnCl₂ (jeweils 1 mM) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS/Tween 20 und qH₂O und Trocknen unter N₂ wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch j)

92 wurde in Puffer (0.1 M Na₂CO₃ mit 20% Glycerol) und Zugabe von EDAC/NHS (5 mg/mL) in vier Konzentrationen (8, 4, 2, 1 mM) auf einem Aldehyd-funktionalisierten Slide (*Nexterion*, Slide AL, Bestellnummer 39-1064874, Deutschland) gespottet. Auf dem gleichen Slide wurden **93**, **94** und **95** in Puffer (0.1 M Na₂CO₃ mit 15% DMF und 15% Glycerol) und Zugabe von DDC/NHS (5 mg/mL) in vier Konzentrationen (16, 8, 4, 1 mM) gespottet. Nach 18 h wurde mit qH₂O, Ethanol und MeOH gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (0.5% in PBS) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 gewaschen. Zu dem Slide wurde FITC-ConA in PBS in vier Konzentrationen (50, 25, 12, 6 µg/mL) mit CaCl₂/MnCl₂ (jeweils 1 mM) gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS/Tween 20 und qH₂O und Trocknen unter N₂ wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch k)

92 wurde in Puffer (0.1 M Na₂CO₃ mit 20% Glycerol) und Zugabe von EDAC/NHS (5 mg/mL) in vier Konzentrationen (8, 4, 2, 1 mM) auf ein Slide (*Nexterion*, Slide AL, Bestellnummer 39-1064874, Deutschland) gespottet. Auf dem gleichen Slide wurden **93**, **94** und **95** in Puffer (0.1 M Na₂CO₃ mit 15% DMF und 15% Glycerol) und Zugabe von DDC/NHS (5 mg/mL) in vier Konzentrationen (16, 8, 4, 1 mM) gespottet. Nach 18 h wurde mit qH₂O, Ethanol und MeOH gewaschen. Zum Blockieren der noch freien Bindungsstellen wurde das Slide 15 Min. in Blocking-Puffer (Bernsteinsäuranhydrid (143 mg), Methyl-2-pyrrolidon (9 mL) und Na-Borat-Puffer (0.2 M)) eingetaucht. Das Slide wurde mit MeOH qH₂O/Tween 20 und qH₂O gewaschen. Danach wurde das Slide in BSA-Lösung (0.5% in

PBS) geschüttelt und mit PBS/Tween 20 gewaschen. Zu dem Slide wurden jeweils FITC-ConA (jeweils 20 µg/mL) mit CaCl₂/MnCl₂ (jeweils 1 mM) in PBS und UEA-I (20 µg/mL) in PBS gegeben und 1 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS/Tween 20 und qH₂O und Trocknen unter N₂ wurde das Slide mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

13.2 Anbindung der aminofunktionalisierten Glykane auf Nexterion-Slides

Versuch l)

Aminofunktionalisierte Mannose **103** wurde in Printing-Puffer (300 mM Phopshat, pH 8.5) auf NHS-aktivierten Glasslides (*Nexterion*, Slide H, Bestellnummer 39-1070936, Deutschland) in verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 µM) gespottet. Die Slides wurden 1 h in einer Hybridisierungskammer mit 75% relativer Luftfeuchtigkeit und anschließend im Exsikkator über Nacht getrocknet. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Ethanolamin in 50 mM Boratpuffer, pH 9.2) getaucht. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und unter N₂ getrocknet. Fluoreszenzmarkierte Lektine (AlexaFluor- und FITC-ConA; 5, 10, 25 und 50 µg/ml) in PBS/0.005% Tween 20 wurden für 1 h auf die Slides gegeben. Die Slides wurden anschließend mit PBS/ 0.005% Tween 20, PBS und qH₂O gewaschen, unter N₂ getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch m)

Aminofunktionalisierte Glykane (Glukose **97**, N-Acetyl-Glukosamin **99**, Galaktose **101** und Mannose **103**) wurden in Printing-Puffer (300 mM Phopshat, pH 8.5) auf NHS-aktivierte Glasslides (*Nexterion*, Slide H, Bestellnummer 39-1070936, Deutschland) in einer Konzentration von 100 µM gespottet. Die Slides wurden 1 h in einer Hybridisierungskammer mit 75% relativer Luftfeuchtigkeit und anschließend im Exsikkator über Nacht getrocknet. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Ethanolamin in 50 mM Boratpuffer, pH 9.2) getaucht. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und unter N₂ getrocknet. Fluoreszenzmarkierte Lektine (AlexaFluor-ConA, FITC-AIA, FITC-GS-I, FITC-GS-II) wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml in PBS/0.005% Tween 20 zugegeben.

Nach 1 h wurde das Slide mit PBS/0.005% Tween 20, PBS und qH₂O gewaschen, unter N₂ getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch n)

Aminofunktionalisierte Glykane (Glukose **97**, N-Acetyl-Glukosamin **99**, Galaktose **101** und Mannose **103**) wurden in Printing-Puffer (300 mM Phosphat, pH 8.5) auf NHS-aktivierte Glasslides (*Nexterion*, Slide H, Bestellnummer 39-1070936, Deutschland) in einer Konzentration von 100 µM gespottet. Die Slides wurden 1 h in einer Hybridisierungskammer mit 75% relativer Luftfeuchtigkeit und anschließend im Exsikkator über Nacht getrocknet. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Ethanolamin in 50 mM Boratpuffer, pH 9.2) getaucht. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und unter N₂ getrocknet. UDP-Galaktose (7.3 mg, 0.013 mmol), α-Lactalbumin (1 mg) und Alkalinphosphatase (1 µL) wurden in Reaktionspuffer (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol [Trizma]/MnCl₂, 1 mL) gelöst. Dazu wurde β-(1→4)-Galaktosyltransferase (0.05 U) (*Sigma-Aldrich*, Deutschland) gegeben. In vier Grids wurden jeweils 120 µL dieser Lösung gegeben und 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit qH₂O gewaschen. Fluoreszenzmarkierte Lektine (FITC-ConA, FITC-GS-I) wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml in PBS/0.005% Tween 20 zugegeben. Nach 1 h wurde das Slide mit PBS/0.005% Tween 20, PBS und qH₂O gewaschen, unter N₂ getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch o)

Aminofunktionalisierte Glykane (Glukose **97**, N-Acetyl-Glukosamin **99**, Galaktose **101** und Mannose **103**) wurden in Printing-Puffer (300 mM Phosphat, pH 8.5) auf NHS-aktivierte Glasslides (*Nexterion*, Slide H, Bestellnummer 39-1070936, Deutschland) in einer Konzentration von 100 µM gespottet. Die Slides wurden 1 h in einer Hybridisierungskammer mit 75% relativer Luftfeuchtigkeit und anschließend im Exsikkator über Nacht getrocknet. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Ethanolamin in 50 mM Boratpuffer, pH 9.2) getaucht. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und unter N₂ getrocknet. UDP-Galaktose (7.3 mg, 0.013 mmol), α-Lactalbumin (1 mg) und Alkalinphosphatase (1 µL) wurden in Reaktionspuffer (Trizma/MnCl₂) gelöst und GalT (0.5

U) dazu gegeben. In vier Grids wurden jeweils 120 μL dieser Lösung gegeben und 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit qH_2O gewaschen. Fluoreszenzmarkierte Lektine (FITC-ConA, FITC-GS-I) wurden in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/0.005% Tween 20 zugegeben. Nach 1 h wurde das Slide mit PBS/0.005% Tween 20, PBS und qH_2O gewaschen, unter N_2 getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch p)

Aminofunktionalisierte Glykane (**97**, **99**, **101** und **103**) wurden in Printing-Puffer (300 mM Phosphat, pH 8.5) auf NHS-aktivierte Glasslides (*Nexterion*, Slide H, Bestellnummer 39-1070936, Deutschland) in einer Konzentration von 100 μM gespottet. Die Slides wurden 1 h in einer Hybridisierungskammer mit 75% relativer Luftfeuchtigkeit und anschließend im Exsikkator über Nacht getrocknet. Die Slides wurden mit qH_2O gewaschen und 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Ethanolamin in 50 mM Boratpuffer, pH 9.2) getaucht. Die Slides wurden mit qH_2O gewaschen und unter N_2 getrocknet. UDP-Galaktose (7.3 mg), α -Lactalbumin (1 mg) und Alkaliphosphatase (1 μL) wurden in Reaktionspuffer (Trizma/ MnCl_2) gelöst und GalT (0.2 U) dazu gegeben. In vier Grids wurden jeweils 120 μL dieser Lösung gegeben und 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit qH_2O gewaschen. Fluoreszenzmarkierte Lektine (FITC-ConA, FITC-GS-I) wurden in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/0.005% Tween 20 zugegeben. Nach 1 h wurde das Slide mit PBS/0.005% Tween 20, PBS und qH_2O gewaschen, unter N_2 getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch q)

Aminofunktionalisierte Glykane (**97**, **99**, **101**, **103** und **107**) wurden in Printing-Puffer (300 mM Phosphat, pH 8.5) auf NHS-aktivierte Glasslides (*Nexterion*, Slide H, Bestellnummer 39-1070936, Deutschland) in einer Konzentration von 100 μM gespottet. Die Slides wurden 1 h in einer Hybridisierungskammer mit 75% relativer Luftfeuchtigkeit und anschließend im Exsikkator über Nacht getrocknet. Die Slides wurden mit qH_2O gewaschen und 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Ethanolamin in 50 mM Boratpuffer, pH 9.2) getaucht. Die Slides wurden mit qH_2O gewaschen und unter N_2 getrocknet. Fluoreszenzmarkierte Lektine (FITC-

ConA, FITC-PNA, FITC-ECA, FITC-BPA) wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml in PBS/0.005% Tween 20 zugegeben. Nach 1 h wurde das Slide mit PBS/0.005% Tween 20, PBS und qH₂O gewaschen, unter N₂ getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

Versuch r)

Aminofunktionalisierte Glykane (**97**, **99**, **101**, **103** und **107**) wurden in Printing-Puffer (300 mM Phosphat, pH 8.5) auf NHS-aktivierte Glasslides (*Nexterion*, Slide H, Bestellnummer 39-1070936, Deutschland) in einer Konzentration von 100 µM bzw. 1 mM für **107** gespottet. Die Slides wurden 1 h in einer Hybridisierungskammer mit 75% relativer Luftfeuchtigkeit und anschließend im Exsikkator über Nacht getrocknet. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Ethanolamin in 50 mM Boratpuffer, pH 9.2) getaucht. Die Slides wurden mit qH₂O gewaschen und unter N₂ getrocknet. Fluoreszenzmarkierte Lektine (FITC-ConA, AlexaFluor-ConA und FITC-SBA) wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml in PBS/0.005% Tween 20 zugegeben. Nach 1 h wurde das Slide mit PBS/0.005% Tween 20, PBS und qH₂O gewaschen, unter N₂ getrocknet, mit dem ArrayWoRx Biochip Reader der Firma *Applied Precision* gescannt und mit der Software ScanAlyze ausgewertet.

14 Synthese der Sialyl-Tn Derivate

14.1 Synthese des natürlichen Sialyl-Tn

Synthese von Allyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosid (**112**)

Zu einer Lösung von N-Acetyl-Galaktosamin **111** (442 mg, 2.0 mmol) in Allylalkohol (8 mL) wurde $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (250 μL , 2 mmol) zugegeben und über 2.5 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in Ethanol (5 mL) gelöst und anschließend Diisopropylether zugegeben, so dass **112** als weißer Feststoff (463 mg, 1.8 mmol, 89%) ausfiel.

$R_f = 0.41$ (Acetonitril/Wasser 12:1).

$[\alpha]_D = +133.8$ (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 5.99 (dddd, $J = 17.3, 10.5, 6.1, 5.4$ Hz, 1H, H_b), 5.37 (dd, $J = 17.3, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.28 (dd, $J = 10.5, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.97 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 4.23 (dd, $J = 13.1, 5.4$ Hz, 1H, H_{a1}), 4.19 (dd, $J = 11.1, 3.8$ Hz, 1H, H-2), 4.04 (dd, $J = 13.1, 6.1$ Hz, 1H, H_{a2}), 3.99 (dd, $J = 3.2, 10.7$ Hz, 1H, H-4), 3.93 (dd, $J = 3.2, 11.1$ Hz, 1H, H-3), 3.85-3.62 (m, 3H, H-5, H-6), 2.06 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ 176.16 (CO), 136.72 (C_b), 120.85 (C_c), 99.25 (C-1), 73.95, 71.51, 71.44 (C_a), 70.69, 64.19 (C-6), 52.90, 24.90 (CH_3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{Na}$: 284.1; gef. 284.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Allyl *O*-(methyl(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)uronat)-(2 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- α -galactopyranosid (**113**)

Zu einer Lösung von **112** (97 mg, 0.37 mmol), pulverisiertem Molsieb (0.5 g), AgOTf (135 mg, 0.53 mmol) und DTBP (140 μL , 0.62 mmol) in trockenem THF (1 mL) wurde eine Lösung von **64** (222 mg, 0.44 mmol) in THF (1 mL) gegeben. Nach Rühren über Nacht wurden erneut AgOTf (135 mg, 0.53 mmol), DTBP (135 μL , 0.60 mmol) und **64** (185 mg,

0.36 mmol) zugegeben. Nach 24 h wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (CH₂Cl₂/MeOH 15:1) wurde **113** als weißer Feststoff (39 mg, 0.05 mmol, 14%) erhalten.

R_f = 0.80 (Acetonitril/Wasser 10:1).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.97 (dddd, J = 17.2, 10.4, 6.2, 5.0 Hz, 1H, H_b), 5.42-5.33 (m, 2H, H-7', H-8'), 5.34 (dd, J = 17.2, 1.7 Hz, 1H, H_{c,trans}), 5.20 (dd, J = 10.4, 1.7 Hz, 1H, H_{c,cis}), 4.90-4.82 (m, 1H, H-4'), 4.86 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.55 (m, H-6'), 4.33 (dd, J = 12.4, 2.6 Hz, 1H, H-9'_a), 4.28 (dd, J = 11.0, 3.8 Hz, 1H, H-2), 4.23 (dd, J = 13.2, 5.0 Hz, 1H, H_{a1}), 4.18 (dd, J = 10.8, 2.1 Hz, 1H, H-5), 4.12 (dd, J = 12.4, 5.3 Hz, 1H, H-9'_b), 4.07-3.82 (m, 3H, H_{a2}, H-4, H-5'), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (dd, J = 11.0, 3.1 Hz, 1H, H-3), 3.33 (td, J = 3.3, 2.1, Hz, 2 H, H-6), 2.66 (dd, J = 12.8, 4.7 Hz, 1H, H-3'_e), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.12 (m, H-3'_a), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.86 (s, 6H, 2 NAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 173.94, 173.49, 172.48, 171.89, 171.81, 171.58, 169.63 (7 CO), 134.47 (C_b), 116.53 (C_c), 100.12 (C-2'), 96.83 (C-1), 72.27, 69.66, 69.50, 68.83, 68.76, 68.63, 68.22 (C_a), 67.66, 63.60 (CH₂), 62.33 (CH₂), 52.22 (OCH₃), 50.42, 49.02, 37.71 (C-3'), 21.56, 21.51, 20.04, 19.70, 19.57, 19.52 (6 CH₃).

ESI MS: m/z: ber. für C₃₁H₄₆N₂O₁₈Na: 757.3; gef. 757.1 [M+Na]⁺.

Allyl O-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α- D-galacto-2-nonulopyranosyl)uronsäure-(2→6)-2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranosid (114)

113 (40 mg, 0.05 mmol) wurde in MeOH/Wasser (5 mL) gelöst und 0.5 M NaOH bis pH 10 zugegeben. Nach einstündigem Rühren wurde Amberlite IR 120 H⁺ zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **114** wurde als weißer Feststoff erhalten (30 mg, 0.05 mmol, quant.).

R_f = 0.51 (EtOAc/AcOH/Wasser 3:2:1).

[α]_D = +43.2 (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 5.99 (dddd, $J = 17.3, 10.4, 6.3, 5.3$ Hz, 1H, H_b), 5.37 (d, $J = 17.3, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.29 (dd, $J = 10.4, 1.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.96 (dd, $J = 12.9, 5.3$ Hz, 1H, H_{a1}), 4.23 (dd, $J = 12.9, 6.3$ Hz, 1H, H_{a2}), 4.17 (dd, $J = 11.0, 3.8$ Hz, 1H), 4.13-4.04 (m, 1H), 4.03 (dd, $J = 3.7, 0.9$ Hz, 1H), 4.00-3.80 (m, 5H), 3.76-3.44 (m, 5H), 2.75 (dd, $J = 12.4, 4.6$ Hz, 1H, $\text{H-3}'_e$), 2.07-2.04 (m, 1H, $\text{H-3}'_a$), 1.93 (s, 6H, 2 NAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 177.94 (CO), 177.49 (CO), 176.29 (CO), 136.59 (C_b), 120.98 (C_c), 103.31 ($\text{C-2}'$), 99.15 (C-1), 75.48, 74.66, 72.41, 71.61 (C_a), 71.39 71.15, 71.11, 70.42, 66.59 (C-9), 65.53 (C-6), 54.78 (C-2), 52.75 (C-5), 43.14 ($\text{C-3}'$), 24.96 (CH_3), 24.85 (CH_3).

ESI MS: m/z : ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_{14}$: 551.2 gef. 551.1 $[\text{M-H}]^-$.

14.2 Synthese von thioverknüpftem Sialyl-Tn

Allyl 2-acetamido-2-deoxy-6-*O*-*para*-toluolsulfonyl- α -D-galactopyranosid (**115**)

Zu einer gerührten Lösung von **112** (496 mg, 1.9 mmol) in Pyridin (6 mL) wurde *para*-Toluolsulfonsäurechlorid (540 mg, 2.8 mmol, 1.5 Äquiv.) in Pyridin (5 mL) bei 0 °C über 30 Min. zugegeben. Nach Rühren über 16 h bei 0 °C wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1) erhielt man **115** als weißen Feststoff (240 mg, 0.6 mmol, 30%).

$R_f = 0.38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1).

$[\alpha]_D = +67.8$ (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.26 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Aryl-H), 6.05 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, NH), 5.79 (dddd, $J = 17.2, 10.4, 6.2, 5.4$ Hz, 1H, H_b), 5.19 (dd, $J = 17.2, 1.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.13 (dd, $J = 10.4, 1.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 4.72 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-1), 4.24-4.11 (m, 3H), 4.05 (dd, $J = 12.9, 5.4$ Hz, 1H, H_{a1}), 3.92 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J = 12.9, 6.2$ Hz, 1H, H_{a2}), 3.81 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.68 (dd, $J = 10.6, 3.1$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H, CH_3Ph), 1.93 (NHAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.40 (CO), 144.86 (Aryl- C_{quart}), 133.40 (C_b), 132.95 (Aryl- C_{quart}), 129.83 (2 Aryl-C), 127.91 (2 Aryl-C), 118.10 (C_c), 96.60 (C-1), 70.13, 69.57 (C_a), 68.55, 68.46, 68.41 (C-6), 50.19, 23.30 (CH_3Ph), 21.63 (NCOCH_3).

ESI MS: m/z: ber. für C₁₈H₂₅NO₈SNa: 438.1; gef. 438.0 [M+Na]⁺.

Allyl 2-acetamido-2-deoxy-3,4-O-Isopropyliden- α -D-galactopyranosid (117)

112 (365 mg, 1.4 mmol), *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (20 mg, 0.1 mmol) und 2,2-Dimethoxypropan (690 μ L, 7.8 mmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst und gerührt. Nach 3 h wurden erneut *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (10 mg, 0.05 mmol) und 2,2-Dimethoxypropan (600 μ L, 6.8 mmol) zugegeben. Es wurde über Nacht gerührt, Triethylamin (263 μ L, 1.9 mmol) zugeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/MeOH 15:1) lieferte **117** (147 mg, 0.49 mmol, 35%).

R_f = 0.47 (EtOAc/MeOH 20:1).

[α]_D = +61.7 (c 1.0, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.97 (dddd, J = 17.3, 10.5, 6.1, 5.4, 1H, H_b), 5.32 (dd, J = 17.3, 1.6 Hz, 1H, H_c), 5.18 (dd, J = 10.5, 1.6 Hz, 1H, H_c), 4.78 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H-1), 4.25 (dd, J = 4.9, 2.5 Hz, 1H), 4.22-4.16 (m, 2H), 4.11 (dd, J = 9.2, 3.3 Hz, 1H), 4.06 (dt, J = 6.2, 2.5 Hz, 1H), 3.99 (tdd, J = 13.2, 6.1, 1H, H_{a2}), 3.78 (m, 2H), 1.98 (s, 3H, NAc), 1.47 (s, 3H, OCH₃), 1.31 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 173.61 (CO), 135.25 (C_b), 117.67 (C_c), 110.52 (C_{quart}), 98.03 (C-1), 75.14, 74.29, 69.84, 69.39 (C_a), 62.76 (C-6), 52.67, 28.44 (OCH₃), 26.76 (OCH₃), 22.54 (NAc).

ESI MS: m/z: ber. für C₁₄H₂₃NO₆Na: 324.1; gef. 324.1 [M+Na]⁺.

Allyl 2-acetamido-2-deoxy-3,4-O-Isopropyliden-6-O-trifluormethansulfonyl- α -D-galactopyranosid (118)

Trifluormethansulfonsäureanhydrid (105 μ L 0.6 mmol) wurde über 30 Min. zu einer Mischung von **117** (75 mg, 0.25 mmol) und Pyridin (60 μ L) bei -25 °C zugetropft. Es wurde 1 h bei -10 °C gerührt, Eis zugegeben, die organische Phase extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/CH₂Cl₂) lieferte **118** (20 mg, 0.05 mmol, 18%).

$R_f = 0.83$ (EtOAc/Pentan 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.91 (m, 1H, H_b), 5.25 (dd, $J = 17.2, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{trans}}$), 5.15 (dd, $J = 10.4, 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{c,\text{cis}}$), 5.04 (m, 1H), 4.66-4.56 (m, 1H) 4.52 (dd, $J = 14.4, 7.4$ Hz, 1H), 4.33-4.27 (m, 1H, H_{a1}), 4.22 (dd, $J = 5.1, 2.7$ Hz, 1H), 4.17-4.09 (m, 2H), 3.73-3.67 (m, 2H), 2.10 (s, 3H, NAc), 1.47 (s, 3H, OCH_3), 1.31 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 178.80 (CO), 137.53 (C_b), 128.03 (CF_3), 121.63 (C_c), 112.76 (C_{quart}), 90.75 (C-1), 73.36, 73.30, 71.64 (C_a), 67.18 (C-6), 55.46, 47.89, 27.62 (OCH_3), 26.20 (OCH_3), 20.54 (NAc).

15 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

3-MPA	3-Mercaptopropionsäure
6-MHA	6-Mercaptohexansäure
11-MUDA	11-Mercaptoundecansäure
16-MHDA	16-Mercaptohexadecansäure
AcOH	Essigsäure
AgOTf	Silbertriflat
AIA	Artocarpus integrifolia Lektin
ber.	berechnet
BF ₃ ·OEt ₂	Bortrifluoridetherat
BPA	Bauhinia purpurea Lektin
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
CaCl ₂	Calciumchlorid
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
ConA	Concanavalin A
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTBP	2,6-di- <i>tert</i> -Butylpyridin
ECA	Erythrina cristagalli Lektin
EDAC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisierungs Massenspektrometrie
EtOAc	Essigsäureethylester
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GalT	β -1,4-Galaktosyltransferase
gef.	gefunden
GS-I	Griffonia simplicifolia Lektin I
GS-II	Griffonia simplicifolia Lektin II
GTFA	Glykosyltransferase A aus <i>Lactobacillus reuteri</i>
GTFR	Glykosyltransferase R aus <i>Streptococcus oralis</i>
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnCl ₂	Manganchlorid
N ₂	Stickstoff
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaOMe	Natriummethanolat
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccimid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PNA	peanut lectin agglutinin
RT	Raumtemperatur
SBA	soya bean agglutinin
Smp.	Schmelzpunkt
THF	Tetrahydrofuran
Trizma	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UDP	Uridintriphosphat

16 Literatur

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al., *Science* **2001**, 291, 1304.
- [2] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chisoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al., *Nature* **2001**, 409, 860.
- [3] A. Varki, *Essentials of glycobiology*, 2. ed. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **2009**.
- [4] S. D. Rosen, *Annu Rev Immunol* **2004**, 22, 129.
- [5] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97.
- [6] C.-H. Wong, *Carbohydrate-based drug discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [7] S. I. Hakomori, *Cancer Research* **1985**, 45, 2405.
- [8] F. Lieben, *Geschichte der Physiologischen Chemie*, Wien/Leipzig, **1935**.

- [9] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1473, 4.
- [10] J. Hofsteenge, D. R. Müller, T. de Beer, A. Löffler, W. J. Richter, J. F. Vliegthart, *Biochemistry* **1994**, 33, 13524.
- [11] R. A. Dwek, T. D. Butters, F. M. Platt, N. Zitzmann, *Nat Rev Drug Discov* **2002**, 1, 65.
- [12] P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, 33, 17.
- [13] G. Kern, D. Kern, R. Jaenicke, R. Seckler, *Protein Sci* **1993**, 2, 1862.
- [14] D. F. Wyss, G. Wagner, *Curr Opin Biotechnol* **1996**, 7, 409.
- [15] P. Devaux, B. Loveland, D. Christiansen, J. Milland, D. Gerlier, *J Gen Virol* **1996**, 77 (Pt 7), 1477.
- [16] H. Cremer, R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff, et al., *Nature* **1994**, 367, 455.
- [17] G. Opdenakker, P. M. Rudd, M. Wormald, R. A. Dwek, J. Van Damme, *Faseb J* **1995**, 9, 453.
- [18] B. Schenk, F. Fernandez, C. J. Waechter, *Glycobiology* **2001**, 11, 61R.
- [19] S. Wopereis, D. J. Lefeber, E. Morava, R. A. Wevers, *Clin Chem* **2006**, 52, 574.
- [20] K. Julenius, A. Molgaard, R. Gupta, S. Brunak, *Glycobiology* **2005**, 15, 153.
- [21] L. Otvos, Jr., G. R. Krivulka, L. Urge, G. I. Szendrei, L. Nagy, Z. Q. Xiang, H. C. Ertl, *Biochim Biophys Acta* **1995**, 1267, 55.
- [22] R. Shogren, T. A. Gerken, N. Jentoft, *Biochemistry* **1989**, 28, 5525.
- [23] M. C. Rose, W. A. Voter, H. Sage, C. F. Brown, B. Kaufman, *J Biol Chem* **1984**, 259, 3167.
- [24] P. Van den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit Rev Biochem Mol Biol* **1998**, 33, 151.
- [25] A. Glithero, J. Tormo, J. S. Haurum, G. Arsequell, G. Valencia, J. Edwards, S. Springer, A. Townsend, Y. L. Pao, M. Wormald, R. A. Dwek, E. Y. Jones, T. Elliott, *Immunity* **1999**, 10, 63.
- [26] J. G. Cyster, D. M. Shotton, A. F. Williams, *Embo J* **1991**, 10, 893.
- [27] D. A. Carlow, B. Ardman, H. J. Ziltener, *J Immunol* **1999**, 163, 1441.
- [28] G. Reuter, H. J. Gabius, *Cell Mol Life Sci* **1999**, 55, 368.

- [29] R. Raman, V. Sasisekharan, R. Sasisekharan, *Chem Biol* **2005**, *12*, 267.
- [30] A. T. Remaley, M. Ugorski, N. Wu, L. Litzky, S. R. Burger, J. S. Moore, M. Fukuda, S. L. Spitalnik, *J Biol Chem* **1991**, *266*, 24176.
- [31] D. E. Levy, P. Fügedi, F. Levy, *The organic chemistry of sugars*, Taylor & Francis, Boca Raton, Fla., **2006**.
- [32] R. Lemieux, J. Hayami, *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2162.
- [33] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957.
- [34] T. Mukaiyama, Y. Murai, S. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, 431.
- [35] S. Hashimoto, M. Hayashi, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1379.
- [36] T. Matsumoto, H. Maeta, K. Suzuki, G. Tsuchihashi, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3567.
- [37] K. Suzuki, H. Maeta, T. Matsumoto, G. Tsuchihashi, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3571
- [38] A. T. Carmona, A. J. Moreno-Vargas, I. Robina, *Current Organic Synthesis* **2008**, *5*, 33.
- [39] A. T. Carmona, A. J. Moreno-Vargas, I. Robina, *Current Organic Synthesis* **2008**, *5*, 81.
- [40] K. Suzuki, H. Maeta, T. Matsumoto, I. G-i. Tsuchihashi, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3571.
- [41] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 763.
- [42] M. Numata, M. Sugimoto, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr Res* **1990**, *203*, 205.
- [43] S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepinsky, *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 131.
- [44] R. L. Halcomb, S. H. Boyer, S. J. Danishefsky, *Angew Chem Int Ed Engl* **1992**, *31*, 338.
- [45] K. C. Nicolaou, E. P. Schreiner, Y. Iwabuchi, T. Suzuki, *Angew Chem Int Ed Engl* **1992**, *31*, 340.
- [46] J. Mlynarski, J. Ruiz-Caro, A. Fürstner, *Chemistry* **2004**, *10*, 2214.
- [47] M. Sugimoto, K. Fujikura, S. Nunomura, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1435.
- [48] M. Sugimoto, K. Fujikura, S. Nunomura, T. Horisaki, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 385.

- [49] P. Fügedi, H. Lönn, P. J. Garegg, T. Norberg, *Glycoconjugate J.* **1987**, 97.
- [50] D. Kahne, S. Walker, Y. Chang, D. V. Engen, *J Am Chem Soc* **1989**, 111, 6881.
- [51] R. Lemieux, S. Levine, *Can. J. Chem.* **1964**, 42, 1473.
- [52] S. Hashimoto, T. Honda, S. Ikegami, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 685.
- [53] H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J Am Chem Soc* **1992**, 114, 8748.
- [54] B. Fraser-Reid, P. Konradsson, D. Mootoo, U. Udodong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 823.
- [55] S. P. Douglas, D. Whitfield, J. J. Krepinsky, *J Am Chem Soc* **1994**, 117, 2116.
- [56] H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, *J Am Chem Soc* **2001**, 123, 3848.
- [57] R. Thürmer, M. Meisenbach, H. Echner, A. Weiler, R. A. Al-Qawasmeh, W. Voelter, U. Korff, W. Schmitt-Sody, *Rapid Commun. Mass Spectrometry* **1998**, 12, 398.
- [58] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X. S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C. H. Wong, *J Am Chem Soc* **1999**, 121, 734.
- [59] F. Burkhart, Z. Zhang, S. Wacowich-Sgarbi, C. H. Wong, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, 40, 1274.
- [60] S. Menard, E. Tagliabue, S. Canevari, G. Fossati, M. I. Colnaghi, *Cancer Res* **1983**, 43, 1295.
- [61] E. G. Bremer, S. B. Levery, S. Sonnino, R. Ghidoni, S. Canevari, R. Kannagi, S. Hakomori, *J Biol Chem* **1984**, 259, 14773.
- [62] S. Canevari, G. Fossati, A. Balsari, S. Sonnino, M. I. Colnaghi, *Cancer Res* **1983**, 43, 1301.
- [63] G. Ragupathi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 563.
- [64] J. M. Fréchet, C. Schuerch, *J Am Chem Soc* **1971**, 93, 492.
- [65] M. Renil, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6185.
- [66] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2091.
- [67] K. Gordon, Balasubramanian, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, 74, 835.
- [68] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, 55, 4855.
- [69] O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, 291, 1523.

- [70] M. C. Hewitt, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 13434.
- [71] L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M. A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, *418*, 785.
- [72] J. Seibel, H.-J. Jördening, K. Buchholz, *Biocatalysis and biotransformation* **2006**, *24*, 311.
- [73] S. Chinnathambi, A. Lachke, *Biotechnology Techniques* **1997**, *11*, 589.
- [74] V. Laroute, R. M. Willemot, *Enzyme and Microbial Technology* **1992**, *14*, 528.
- [75] E. N. Vulfson, R. Patel, J. E. Beecher, A. T. Andrews, B. A. Law, *Enzyme and Microbial Technology* **1990**, *12*, 950.
- [76] J. E. Beecher, A. T. Andrews, E. N. Vulfson, *Enzyme and Microbial Technology* **1990**, *12*, 955.
- [77] S. Kobayashi, K. Kashiwa, T. Kawasaki, S. I. Shoda, *J Am Chem Soc* **1991**, *113*, 3079.
- [78] L. F. Mackenzie, Q. Wang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 5583.
- [79] D. L. Jakeman, S. G. Withers, *Canadian Journal of Chemistry* **2002**, *80*, 866.
- [80] M. Hrmova, T. Imai, S. J. Rutten, J. K. Fairweather, L. Pelosi, V. Bulone, H. Driguez, G. B. Fincher, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 30102.
- [81] M. Okuyama, H. Mori, K. Watanabe, A. Kimura, S. Chiba, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2002**, *66*, 928.
- [82] M. Jahn, J. Marles, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 352.
- [83] M. P. Murrell, K. J. Yarema, A. Levchenko, *Chembiochem* **2004**, *5*, 1334.
- [84] S. Roseman, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 41527.
- [85] X. Qian, K. Sujino, M. M. Palcic, *Enzymatic glycosylations with non-natural donors and acceptors, Vol. 2*, **2000**.
- [86] K. Sujino, T. Uchiyama, O. Hindsgaul, N. O. L. Seto, W. W. Wakarchuk, M. M. Palcic, *J Am Chem Soc* **2000**, *122*, 1261.
- [87] K. F. Johnson, *Glycoconjugate Journal* **1999**, *16*, 141.
- [88] C. H. Wong, G. M. Whitesides, *J Org Chem* **1982**, *47*, 2816.
- [89] E. Cabib, L. F. Leloir, *J Biol Chem* **1954**, *206*, 779.

- [90] E. Cabib, L. F. Leloir, C. E. Cardini, *J Biol Chem* **1953**, 203, 1055.
- [91] R. Caputto, L. F. Leloir, C. E. Cardini, A. C. Paladini, *J Biol Chem* **1950**, 184, 333.
- [92] C. E. Cardini, A. C. Paladini, R. Caputto, L. F. Leloir, *Nature* **1950**, 165, 191
- [93] H. H. Freeze, *Monosaccharide metabolism*, **1999**.
- [94] X. M. He, H. W. Liu, in *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 71, **2002**, pp. 701.
- [95] V. Monchois, R. M. Willemot, P. Monsan, *FEMS Microbiol Rev* **1999**, 23, 131.
- [96] P. Monsan, S. Bozonnet, C. Albenne, G. Joucla, R. M. Willemot, M. Remaud-Simeon, *International Dairy Journal* **2001**, 11, 675.
- [97] C. A. Magali Remaud-Simeon, Gilles Joucia, Emeline Fabre, Sophie Bozonnet, Sandra Pizzut, Pierre Escalier, Gabrielle Potocki-Veronese, Pierre Monsan, in *Glucansucrases: Structural Basis, Mechanistic Aspects, and New Perspectives for Engineering*, Vol. 849 (Eds.: G. Eggleston, G. L. Cote), American Chemical Society, **2003**, pp. 90.
- [98] J. F. Robyt, T. F. Walseth, *Carbohydr Res* **1978**, 61, 433.
- [99] J. F. Robyt, S. H. Eklund, *Bioorg. Chem.* **1982**, 11, 115.
- [100] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu Rev Biochem* **1996**, 65, 441.
- [101] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem Biol* **1996**, 3, 71.
- [102] M. L. Doyle, *Curr Opin Biotechnol* **1997**, 8, 31.
- [103] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321.
- [104] S. Park, M. R. Lee, I. Shin, *Chemical Communications* **2008**, 4389.
- [105] C. Ortiz Mellet, J. M. Garcia Fernandez, *Chembiochem* **2002**, 3, 819.
- [106] J. L. Magnani, D. F. Smith, V. Ginsburg, *Anal. Biochem.* **1980**, 109, 399.
- [107] P. W. Tang, T. Feizi, *Carbohydr Res* **1987**, 161, 133.
- [108] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat Biotechnol* **2002**, 20, 275.
- [109] W. G. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, *Proteomics* **2002**, 2, 1666.
- [110] K. S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 13162.

- [111] S. Park, I. Shin, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 3180.
- [112] J. Seibel, H. Hellmuth, B. Hofer, A. M. Kicinska, B. Schmalbruch, *Chembiochem* **2006**, *7*, 310.
- [113] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 14397.
- [114] S. Angeloni, J. L. Ridet, N. Kusy, H. Gao, F. Crevoisier, S. Guinchard, S. Kochhar, H. Sigrist, N. Sprenger, *Glycobiology* **2005**, *15*, 31.
- [115] B. Xia, Z. S. Kawar, T. Ju, R. A. Alvarez, G. P. Sachdev, R. D. Cummings, *Nat Methods* **2005**, *2*, 845.
- [116] N. Laurent, J. Voglmeir, A. Wright, J. Blackburn, N. T., P. Stephen, C. C. Wong, S. J. Gaskell, S. L. Flitsch, *Chembiochem* **2008**, *9*, 883.
- [117] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C. H. Wong, J. C. Paulson, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 17033.
- [118] L. Nimrichter, A. Gargir, M. Gortler, R. T. Altstock, A. Shtevi, O. Weisshaus, E. Fire, N. Dotan, R. L. Schnaar, *Glycobiology* **2004**, *14*, 197.
- [119] J. C. Paulson, O. Blixt, B. E. Collins, *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 238.
- [120] B. S. Bochner, R. A. Alvarez, P. Mehta, N. V. Bovin, O. Blixt, J. R. White, R. L. Schnaar, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 4307.
- [121] V. S. Hinshaw, R. G. Webster, C. W. Naeve, B. R. Murphy, *Virology* **1983**, *128*, 260.
- [122] J. N. S. S. Couceiro, J. C. Paulson, L. G. Baum, *Virus Research* **1993**, *29*, 155.
- [123] A. S. Beare, R. G. Webster, *Archives of Virology* **1991**, *119*, 37.
- [124] J. Stevens, O. Blixt, L. Glaser, J. K. Taubenberger, P. Palese, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *J Mol Biol* **2006**, *355*, 1143.
- [125] R. E. Mandrell, R. McLaughlin, Y. Aba Kwaik, A. Lesse, R. Yamasaki, B. Gibson, S. M. Spinola, M. A. Apicella, *Infect Immun* **1992**, *60*, 1322.
- [126] D. Wang, J. Lu, *Physiol Genomics* **2004**, *18*, 245.
- [127] M. C. Bryan, L. V. Lee, C. H. Wong, *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14*, 3185.
- [128] S. Park, I. Shin, *Org Lett* **2007**, *9*, 1675.

- [129] N. Laurent, J. Voglmeir, A. Wright, J. Blackburn, N. T. Pham, S. C. Wong, S. J. Gaskell, S. L. Flitsch, *Chembiochem* **2008**, 9, 883.
- [130] O. Blixt, K. Allin, O. Bohorov, X. Liu, H. Andersson-Sand, J. Hoffmann, N. Razi, *Glycoconj J* **2008**, 25, 59.
- [131] E. Kaltgrad, S. Sen Gupta, S. Punna, C. Y. Huang, A. Chang, C. H. Wong, M. G. Finn, O. Blixt, *Chembiochem* **2007**, 8, 1455.
- [132] M. D. Disney, O. J. Barrett, *Biochemistry* **2007**, 46, 11223.
- [133] F. Kamena, M. Tamborrini, X. Liu, Y. U. Kwon, F. Thompson, G. Pluschke, P. H. Seeberger, *Nat Chem Biol* **2008**, 4, 238.
- [134] Z. J. Witczak, J. M. Culhane, *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, 69, 237.
- [135] P. K. Qasba, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, *Aaps J* **2006**, 8, E190.
- [136] J. Seibel, R. Beine, R. Moraru, C. Behringer, K. Buchholz, *Biocatalysis and Biotransformation* **2006**, 24, 157
- [137] S. A. van Hijum, S. Kralj, L. K. Ozimek, L. Dijkhuizen, I. G. van Geel-Schutten, *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**, 70, 157.
- [138] K. Demuth, H. J. Jordening, K. Buchholz, *Carbohydr Res* **2002**, 337, 1811.
- [139] T. P. Binder, G. L. Cote, J. F. Robyt, *Carbohydr Res* **1983**, 124, 275.
- [140] M. Dols, M. R. Simeon, R. M. Willemot, M. R. Vignon, P. F. Monsan, *Carbohydr Res* **1997**, 305, 549.
- [141] M. Remaud-Simeon, A. Lopez-Munguia, V. Pelenc, F. Paul, P. Monsan, *Appl Biochem Biotechnol* **1994**, 44, 101.
- [142] G. L. Côté, J. F. Robyt, *Carbohydr Res* **1982**, 111, 127.
- [143] E. Montero, J. Alonso, F. J. Canada, A. Fernandez-Mayoralas, M. Martin-Lomas, *Carbohydr Res* **1997**, 305, 383.
- [144] K. G. I. Nilsson, A. Fernández-Mayoralas, *Biotechnol. Lett.* **1991**, 13, 715.
- [145] D. A. MacManus, E. N. Vulfson, *Biotechnol Bioeng* **2000**, 69, 585.
- [146] L. L. Lairson, A. G. Watts, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, *Nat Chem Biol* **2006**, 2, 724.
- [147] S. Kralj, G. H. van Geel-Schutten, M. J. van der Maarel, L. Dijkhuizen, *Microbiology* **2004**, 150, 2099.

- [148] S. Kralj, E. Stripling, P. Sanders, G. H. van Geel-Schutten, L. Dijkhuizen, *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*, 3942.
- [149] L. Greffe, M. T. Jensen, F. Chang-Pi-Hin, S. Fruchard, M. J. O'Donohue, B. Svensson, H. Driguez, *Chemistry* **2002**, *8*, 5447.
- [150] S. Koro, N. Morishima, C. Kusuhara, S. Sekido, T. Yoshida, S. Zen, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 2995.
- [151] C. Slawson, M. P. Housley, G. W. Hart, *J Cell Biochem* **2006**, *97*, 71.
- [152] K. A. Ness, M. E. Migaud, *Beilstein J Org Chem* **2007**, *3*, 26.
- [153] P. J. Garegg, T. Iversen, S. Oscarson, *Carbohydr Res* **1977**, *53*, C5.
- [154] Z. J. Witczak, R. Chhabra, H. Chen, X.-Q. Xie, *Carbohydr Res* **1997**, *301*, 167.
- [155] D. Ramos, P. Rollin, W. Klaffke, *J Org Chem* **2001**, *66*, 2948.
- [156] S. Weingarten, J. Thiem, *Synlett* **2003**.
- [157] M. A. Bernstein, L. D. Hall, *Carbohydr Res* **1980**, *78*, C1.
- [158] H. Lis, N. Sharon, *Chem Rev* **1998**, *98*, 637.
- [159] H. Rudiger, H. J. Gabius, *Glycoconj J* **2001**, *18*, 589.
- [160] P. Schoffski, S. Riggert, P. Fumoleau, M. Campone, O. Bolte, S. Marreaud, D. Lacombe, B. Baron, M. Herold, H. Zwierzina, K. Wilhelm-Ogunbiyi, H. Lentzen, C. Twelves, *Ann Oncol* **2004**, *15*, 1816.
- [161] R. Gutierrez Gallego, S. R. Haseley, V. F. van Miegem, J. F. Vliegthart, J. P. Kamerling, *Glycobiology* **2004**, *14*, 373.
- [162] J. C. Manimala, T. A. Roach, Z. Li, J. C. Gildersleeve, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 3607.
- [163] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem Biol* **2002**, *9*, 443.
- [164] Peqlab, <http://www.peqlab.de>.
- [165] Z. J. Witczak, J. Sun, R. Mielguj, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1995**, *5*, 2169.
- [166] Z. J. Witczak, P. Kaplon, P. M. Dey, *Carbohydr Res* **2003**, *338*, 11.
- [167] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Research* **1989**, *49*, 197.

- [168] M. Yuan, S. H. Itzkowitz, C. R. Boland, *Cancer Research* **1986**, 46, 4841.
- [169] D. W. Miles, L. C. Happerfield, P. Smith, R. Gillibrand, L. G. Bobrow, W. M. Gregory, R. D. Rubens, *British Journal of Cancer* **1994**, 70, 1272.
- [170] A. Kurosaka, H. Kitagawa, S. Fukui, Y. Numata, H. Nakada, I. Funakoshi, T. Kawasaki, T. Ogawa, H. Iijima, I. Yamashina, *J Biol Chem* **1988**, 263, 8724.
- [171] <http://www.merck.at/produkte/tumorvakzine.htm>.
- [172] E. Dabelsteen, *Journal of Pathology* **1996**, 179, 358.
- [173] S. Takao, K. Uchikura, S. Yonezawa, H. Shinchu, T. Aikou, *Cancer* **1999**, 86, 1966.
- [174] R. Ojeda, J. L. de Paz, A. G. Barrientos, M. Martín-Lomas, S. Penadés, *Carbohydr Res* **2007**, 342, 448.
- [175] R. T. Sleeter, H. B. Sinclair, *J Chromatogr* **1970**, 49, 543.

17 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Jürgen Seibel, der mich während der gesamten Dissertation vorbildlich unterstützt hat. Seine beeindruckende Hilfsbereitschaft und Geduld haben für eine einzigartige Arbeitsatmosphäre gesorgt. Seine Tür war immer offen für meine Fragen und er hat mir mit fachlichem Rat und wertvollen Diskussionen bei der Bearbeitung von Problemstellungen sehr geholfen.

Genauso gilt mein Dank Apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening und Prof. Dr. Klaus Buchholz für ihre engagierte Teilnahme an meiner Arbeit. Sie waren immer für mich da und haben mich mit ihrer Erfahrung und ihrem Wissen auf die beste Weise unterstützt.

Den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Seibel namentlich Rafael Beine, Sven Götze, Hendrik Hellmuth, Sven Höbbel, Arne Homann, Roxana Moraru, Anja Moszyk, Athar Nadeem, Riaz ul-Qamar, Bodo Schmalbruch und Malte Timm danke ich für Ihre Unterstützung und hilfreichen Diskussionen. Es war eine Freude, in solch einer angenehmen Arbeitsatmosphäre zu forschen.

Claudia Wylegalla und Dr. Robert Geffers vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung danke ich für Hilfsbereitschaft und die Durchführung zahlreicher Mikroarray-Messungen. Ebenso möchte ich der Spektroskopie-Abteilung an der TU Braunschweig für die Aufnahme zahlreicher NMR- und Massenspektren danken.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt danke ich für die Unterstützung mit einem Promotionsstipendium. Die zahlreichen Seminare und Treffen als auch die Unterstützung durch Dr. Maximilian Hempel waren eine große Bereicherung für mich.

Prof. Dr. Monika Mazik danke ich für die freundliche Teilnahme an der Prüfungskommission.

Abschließend möchte ich meiner Familie für ihre grenzenlose Hilfe und Geduld danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

18 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lars Hillringhaus
Geburtsdatum	07.02.1979
Geburtort	Wuppertal
Familienstand	verheiratet

Studium

April 2000 – April 2005	TU Braunschweig, Studium der Chemie, Abschluss: Diplomprüfung
April 2000 – September 2000	RWTH Aachen, Studium der Chemie

Schulausbildung & Zivildienst

August 1998 – August 1999	Zivildienst: Individuelle Schwerbehindertenbetreuung, Lebenshilfe Sylt e.V.
August 1998 – September 1998	Zivildienst: Altenpflege, Evangelische Altenhilfe Wuppertal
August 1989 – Juni 1998	Carl-Duisberg-Gymnasium, Abschluss: Abitur

Stipendien & Tätigkeiten

Dezember 2005 – November 2008	Promotionsstipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt
September 2003 – Juni 2005	Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Technische Chemie, Abteilung für Technologie der Kohlenhydrate
Oktober 2001 – Juni 2002	Wissenschaftliche Hilfskraft, Fraunhofer Institut für Schicht- und Oberflächentechnik

Publikationen & Tagungsbeiträge

Seibel, J. Hillringhaus, L. Moraru. R. Microwave-assisted Glycosylation for the Synthesis of Glycopeptides. Carbohydr Res 2005, 340, 507-511.

Seibel, J., Hillringhaus, L., Schmalbruch, B., Hellmuth, H.: Chemical and Enzymatic Methods for the Synthesis of Oligosaccharides and Glycopeptides (Poster) 9. SFB-Symposium SFB 380, Aachen (2005).

Seibel, J., Moraru, R., Hillringhaus, L., Okoro, L.: Chemical and Enzymatic Methods for the Glycosylation and Glycoconjugation of Natural Products (Poster) First Austrian-German-Italian Meeting of Organic Chemistry, Wien (2005).